



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

GESTAÇÃO EM CADELAS DA RAÇA RETRIEVER DO LABRADOR: ALTERAÇÕES
HEMATOLÓGICAS, PERFIL DE PROGESTERONA E MÉTODOS DE PREVISÃO DA DATA
DO PARTO

RAQUEL FARRAJOTA COELHO DOURADO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente:

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Vogais:

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

Doutora Maria Teresa da Costa Mendes

Vítor Villa de Brito

ORIENTADOR

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

CO-ORIENTADOR

Doutora Isabel Maria Cerqueira Lopes Alves

2018
LISBOA



Este trabalho foi financiado pelo projeto UID/CVT/00276/2013 da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e pelo projeto MIVM 9.2016 do Centro de Investigação Interdisciplinar de Sanidade Animal (CIISA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

GESTAÇÃO EM CADELAS DA RAÇA RETRIEVER DO LABRADOR: ALTERAÇÕES
HEMATOLÓGICAS, PERFIL DE PROGESTERONA E MÉTODOS DE PREVISÃO DA DATA
DO PARTO

RAQUEL FARRAJOTA COELHO DOURADO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente:

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Vogais:

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

Doutora Maria Teresa da Costa Mendes

Vítor Villa de Brito

ORIENTADOR

Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus

CO-ORIENTADOR

Doutora Isabel Maria Cerqueira Lopes Alves

2018
LISBOA

“A verdadeira felicidade está na própria casa, entre as alegrias da família.”

Aos meus avós: Manuel, Noémia, José e Julieta.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Luísa Mateus, que no 4º ano me lecionou a disciplina de Reprodução e Obstetrícia, e que desde aí me cativou pelo seu conhecimento e pela sua admirável capacidade de ensinar. Obrigada por toda a disponibilidade e por todo o apoio prestado ao longo deste trabalho, pelo incansável acompanhamento e pelo conhecimento transmitido durante o estágio. Agradeço pelo estágio extracurricular que me conseguiu na École Nationale Vétérinaire d'Alfort (EnVA) e pelo Congresso da European Veterinary Society of Small Animal Reproduction (EVSSAR) ao qual fomos apresentar uma comunicação em forma de painel, sem ela nada disto seria possível. Acima de tudo, o meu sincero obrigada por toda a paciência que teve comigo neste ano, é um exemplo para mim, tanto a nível profissional como pessoal.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Isabel Alves, pelo excelente acompanhamento ao longo de toda a recolha e tratamento de dados para esta dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária e por todos os conhecimentos transmitidos durante este trabalho.

À minha colega, Beatriz Soares, pelo excelente trabalho de equipa desenvolvido, por me ter ajudado a recolher e a tratar parte dos dados necessários para este trabalho, sem ela este projeto não estaria completo.

Ao Professor Doutor Luís Costa, pela ajuda que me prestou na parte estatística deste trabalho, e por todos os ensinamentos que me transmitiu na disciplina de Reprodução e Obstetrícia.

A todos os membros da secção de Reprodução e Obstetrícia, nomeadamente, à Elisabete, à Patrícia, à Cristina e à Marta, o meu sincero agradecimento pela disponibilidade e por toda a amizade.

Ao Centro de Investigação Interdisciplinar de Sanidade Animal (CIISA) e à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pelo apoio financeiro, e às pessoas que constituem o CIISA, que me acolheram durante este projeto e que contribuíram para a sua execução.

Aos Veterinários, Enfermeiros, Auxiliares, e a todos os funcionários do Hospital Escolar da FMV-ULisboa (HEFMV), pelos conhecimentos que neste momento possuo, pelo companheirismo, pelo apoio e por todos os momentos de boa disposição.

Ao Laboratório Braço Forte, particularmente às Doutoradas Alexandra Baço, Salomé Gonçalves e Vera Pereira, pela disponibilidade e eficiência na realização dos hemogramas requisitados.

A todos os Professores e Funcionários desta Faculdade que me acompanharam na vida de estudante, agradeço-lhes por todos conhecimentos transmitidos.

Ao “Canil da Quinta das Tílias” em Palmela, em particular ao criador Sr. José Cansado e a toda a sua família, pela disponibilidade e ajuda prestada na recolha de dados para este projeto, pela forma amável como me receberam em sua casa. Senti-me como se fosse membro da família, Obrigada.

Aos meus Pais, Luísa e Fausto, por me terem tornado na pessoa que sou hoje, por todo o apoio financeiro ao longo do meu percurso académico, pela ajuda prestada nos momentos mais complicados da minha vida e sobretudo por acreditarem em mim com fé e amor incondicional.

À minha irmã, Melissa, que embora chata, conhece-me melhor do que ninguém e acredita sempre em mim.

Ao meu namorado, Sven, pela paciência que tem para me aturar, mas principalmente pelo amor e apoio incondicional com que me acompanha desde 2010.

À minha família mais próxima (avós, tios e primos) que, mesmo sem referir nomes, sabem o quão importantes são para mim, pelo amor e pela ajuda demonstrada ao longo de toda a minha vida.

A todas as amigas que fiz e que me acompanharam ao longo destes 6 anos de curso, nomeadamente, às minhas “Fixes da FMV”: Bia, Inês, Leninha, Laura, Cardoso e Figueiredo, e ao Diogo e Rodrigo, por tudo o que passámos juntos(as), pelo apoio e pela amizade criada.

Aos “amigos da biblioteca”, Xico e Lobo, sem vocês as épocas de exames teriam sido muito mais difíceis.

Às minhas “amigas da tese”, Marias, pelos bons momentos passados no estágio, no ginásio, a passear, a ler artigos ou a escrever a dissertação, a vossa companhia tornou tudo mais fácil.

A todos, que de alguma forma se cruzaram no meu caminho,
E a Deus que me acompanha, OBRIGADA!

RESUMO

GESTAÇÃO EM CADELAS DA RAÇA RETRIEVER DO LABRADOR: ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS, PERFIL DE PROGESTERONA E MÉTODOS DE PREVISÃO DA DATA DO PARTO

A gestação é um período crítico na vida reprodutiva de uma cadela, no qual ocorrem alterações fisiológicas, que devem ser do conhecimento do Médico Veterinário para que não sejam julgadas como patológicas. O intervalo entre os cruzamentos/inseminações e o parto pode ser bastante variável, pelo que a determinação precisa da data do parto é crucial para que haja um correto acompanhamento da gestação, assim como uma ótima assistência aquando do parto. Uma monitorização adequada do estro permite, não só prever o período ideal para cobertura/inseminação da cadela, como também a data do parto. Por forma a minimizar a influência da raça e do manejo a que os animais estão sujeitos, foram utilizadas neste estudo 26 cadelas da raça Retriever do Labrador [18 gestantes (G=18) e 8 não gestantes (NG=8)], pertencentes a um só canil.

O primeiro objetivo deste estudo foi comparar parâmetros hematológicos e perfis das concentrações séricas de progesterona entre cadelas gestantes e não gestantes. Observou-se no grupo gestante, no período pré-parto, uma anemia normocítica, normocrômica ligeira em 45% das cadelas e uma leucocitose, devido a neutrofilia em 55% das cadelas. Verificou-se um perfil semelhante das concentrações séricas de progesterona entre fêmeas gestantes e não gestantes, portanto, o doseamento de progesterona não permite inferir se a fêmea está ou não gestante. No grupo gestante o diestro terminou entre os 63-66 dias após o pico de LH, enquanto no grupo não gestante terminou entre os 73-75 dias após o pico de LH. O segundo objetivo deste trabalho foi avaliar a precisão da previsão da data do parto utilizando como referência o dia da primeira e da última inseminação artificial (IA), o dia do pico de LH, e o dia do início do diestro citológico. O critério mais preciso para prever a data do parto foi o dia do pico de LH [86,7% (65 ± 1 dia); 100% (65 ± 2 dias)] comparativamente com o dia do início do diestro citológico [86,7% (57 ± 1 dia); 86,7% (57 ± 2 dias); 100% (57 ± 3 dias)], sendo o mais falível a data das inseminações. O terceiro, e último, objetivo foi avaliar o impacto da monitorização do proestro/estro na performance reprodutiva. Observou-se que esta monitorização é vantajosa, uma vez que permitiu melhorar as precisões de previsão da data do parto com base na data da última IA e, ainda, diminuir o número de IA por cadela, o que é benéfico para a saúde uterina.

Palavras-chave: Retriever do Labrador; Monitorização do ciclo éstrico; Gestação; Previsão do parto.

ABSTRACT

PREGNANCY IN LABRADOR RETRIEVER BITCHES: HEMATOLOGICAL ALTERATIONS, SERUM PROGESTERONE PROFILE AND METHODS TO PREDICT THE PARTURITION DATE

Pregnancy is a critical period in the reproductive life of a bitch. It is characterized by many physiological changes, which may appear to be pathological in the non-pregnant bitch. Therefore, Veterinarians should be aware of the normal alterations in the pregnant bitch. The length of gestation is highly variable when measured from the day of mating, thus practical methods for accurate determination of the parturition date is crucial for pregnancy monitoring and parturition planning. Correct monitoring of the estrus allows the determination of the LH peak day and the ovulation day, which are used to predict not only the ideal time to mate/inseminate the bitch but also the parturition date. In order to minimize the influence of the breed and animal management, 26 Labrador Retriever bitches [18 pregnant (P = 18) and 8 non-pregnant (NP = 8)] belonging to a single kennel were used in this study.

The first aim of this study was to compare hematological parameters and serum progesterone profiles between pregnant and non-pregnant bitches. Near parturition, in the pregnant group, a normocytic, normochromic mild anemia was observed in 45% of the females and leukocytosis due to neutrophilia was observed in 55% of the females. Progesterone concentration profiles were similar between groups, which excludes the measurement of progesterone as a pregnancy diagnostic test. In the pregnant group, the diestrus ended between 63-66 days after the LH peak, while in the non-pregnant group it ended between 73-75 days after the LH peak.

The second aim of this study was to evaluate the accuracy of predicting the parturition date using as reference the day of the first and last artificial insemination (AI), the LH peak day and the onset of cytological diestrus. The most accurate parameter to predict the delivery date was the LH peak day [86.7% (65 ± 1 day); 100% (65 ± 2 days)] compared to the day of the onset of cytologic diestrus [86.7% (57 ± 1 day); 86.7% (57 ± 2 days); 100% (57 ± 3 days)], with the dates of AI being the most unreliable method. The third aim was to evaluate the impact of proestrus/estrus monitoring on the reproductive performance of the bitches. It allowed to improve prediction accuracies of the parturition date based on the date of the last AI and also to decrease the number of AI per bitch, which is beneficial for the uterine health.

Keywords: Labrador Retriever; Estrous Cycle Monitoring; Pregnancy; Parturition time prediction.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE GRÁFICOS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	ix
I. RELATÓRIO DE ESTÁGIO	1
II. INTRODUÇÃO	3
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1.Ciclo éstrico da cadela	4
1.1 Proestro	4
1.2 Estro	6
1.3 Diestro	7
1.4 Anestro	8
2. Momento ideal para a cobertura/inseminação das cadelas: métodos utilizados para detetar o dia da ovulação	9
2.1 Alterações clínicas	10
2.2 Citologia vaginal	11
2.3 Vaginoscopia	11
2.4 Avaliação ecográfica dos ovários	12
2.5 Análises hormonais	12
2.6 Outros métodos em estudo	13
3.Gestação na cadela: alterações clínicas e laboratoriais	13
3.1 Aspetos clínicos	15
3.2 Parâmetros hematológicos	15
3.2 Parâmetros bioquímicos	16
3.3 Alterações endócrinas	16
4.Previsão da data do parto na cadela	17
4.1 Data dos cruzamentos ou inseminações	18
4.2 Data do pico de LH e da ovulação	18
4.3 Data do primeiro dia de diestro citológico	18
4.4 Imagiologia	18
4.5 Diminuição da concentração sérica de progesterona	20
4.6 Monitorização da temperatura retal ou vaginal	20

IV. MATERIAL E MÉTODOS	22
1. População	22
2. Colheita e análise de amostras	22
2.1 Citologia vaginal	22
2.2 Amostras de sangue.....	23
2.2.1 Doseamento sérico de progesterona	23
2.2.2 Hemograma	23
3. Avaliação da precisão de detecção da data do parto	24
4. Análise estatística	24
V. RESULTADOS	25
1. Avaliação do hemograma e das concentrações séricas de progesterona em cadelas gestantes e não gestantes.....	25
1.1 Hemograma	25
1.2 Perfil de Progesterona.....	28
2. Monitorização do ciclo éstrico	28
2.1 Início do Estro Citológico.....	29
2.2 Determinação do dia do pico de LH	29
2.3 Determinação do dia da ovulação	30
2.4 Início do Diestro Citológico.....	30
3. Previsão da data do parto.....	30
3.1 Previsão da data do parto a partir da data da primeira e da última IA	30
3.2 Previsão da data do parto a partir da data do pico de LH.....	31
3.3 Previsão da data do parto a partir da data do primeiro dia de diestro citológico	31
3.4 Avaliação da concentração sérica de progesterona antes do parto	31
4. Caracterização do desempenho reprodutivo em dois anos consecutivos sem monitorização do proestro/estro.....	32
VI. DISCUSSÃO	34
VII. CONCLUSÃO.....	40
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	41
IX. ANEXOS	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução do ciclo éstrico da cadela, desde o proestro até ao início do diestro citológico, tendo em consideração as alterações da vulva, da citologia vaginal e da concentração sérica de progesterona. 29

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Comparação do número de eritrócitos e dos valores de hemoglobina e hematócrito ao longo do estro e diestro, entre cadelas gestantes e não gestantes da raça Retriever do Labrador. 26

Gráfico 2 - Comparação do número de leucócitos e de neutrófilos ao longo do estro e diestro, entre cadelas gestantes e não gestantes da raça Retriever do Labrador. 27

Gráfico 3 - Perfis de progesterona ao longo do estro e diestro em cadelas gestantes (n = 18) e não gestantes (n = 8) da raça Retriever do Labrador. 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Idade gestacional, baseada na detecção ecográfica de estruturas embrionárias e fetais.....	19
Tabela 2 - Detecção radiográfica de mineralização fetal na cadela.	19
Tabela 3 - Valores médios (\pm erro padrão) do eritrograma, desde o estro até ao final do diestro (T1 a T4), no grupo das cadelas gestantes (n=11) e no grupo das cadelas não gestantes (n=8) da raça Retriever do Labrador.	25
Tabela 4 - Valores médios (\pm erro padrão) do leucograma, desde o estro até ao final do diestro (T1 a T4), no grupo das cadelas gestantes (n=11) e no grupo das cadelas não gestantes (n=8) da raça Retriever do Labrador.	27
Tabela 5 - Precisão da previsão da data do parto (expressa em %), com erro de 1 ou 2 dias, com base na data da primeira e da última inseminação artificial (IA).	30
Tabela 6 - Precisão da previsão da data do parto (expressa em %), com erro de 1 ou 2 dias, com base na data do pico da Hormona Luteinizante (LH).....	31
Tabela 7 - Precisão da previsão da data do parto (expressa em %), com erro de 1, 2 ou 3 dias, com base na data de início do diestro citológico.....	31
Tabela 8 - Concentração sérica de progesterona média (\pm erro padrão) aos 3 dias, 2 dias e 1 dia antes do parto, e no dia do parto.....	32
Tabela 9 - Precisão da previsão da data do parto (expressa em %), com erro de 1 ou 2 dias, com base na data da primeira e da última inseminação artificial (IA), relativa aos dois anos sem monitorização do proestro/estro.	32
Tabela 10 - Comparação do nº de inseminações artificiais (IA) médio (\pm erro padrão) por gestação, da prolificidade (\pm erro padrão) e da fertilidade, entre cadelas com e sem monitorização do proestro/estro.....	33

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% - Percentagem

°C - Grau Celsius

μL - Microlitro

BD - Diâmetro do Corpo

BP - Diâmetro Biparietal

bpm - Batimentos por Minuto

CERCA - Centre d'Étude en Reproduction des Carnivores

CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CHM - Concentração de Hemoglobina Média

CIISA - Centro de Investigação Interdisciplinar de Sanidade Animal

CL - Corpo Lúteo

CLIA - Imunoensaio por Quimiluminescência

CRL - Medida do feto (crown- rump lenght)

dL - Decilitro

DPTV - Vesícula Diencefalo-Telencefálica

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

EnVA - École Nationale Vétérinaire d'Alfort

FCF - Frequência Cardíaca Fetal

FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia

fL - Fentolitro

FMV-ULisboa - Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa

FSH - Hormona Folículo Estimulante

g - Aceleração da gravidade

GH - Hormona do crescimento

GnRH - Hormona Libertadora de Gonadotrofinas

h - Hora

HEFMV - Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa

IA - Inseminação Artificial

ICC - Diâmetro da Cavidade Coriônica

kg - Quilograma

LH - Hormona Luteinizante

MIMV - Metrado Integrado em Medicina Veterinária

min - Minuto

mL - Mililitro

mm - Milímetro

ng - Nanograma

OUT - Diâmetro Uterino Externo

pg - Picograma

PGF_{2α} - Prostaglandina F_{2α}

RIA - Radioimunoensaio

T₃ - Triiodotiroxina

T₄ - Tiroxina

VCM - Volume Corpuscular Médio

I. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O estágio é de extrema importância para o desenvolvimento do Aluno, tanto a nível profissional como pessoal. Esta experiência é fundamental para formar um bom Médico Veterinário.

O estágio curricular foi realizado no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa (HEFMV), tendo como orientadora a Professora Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus (Sector Reprodução e Obstetrícia do HEFMV) e como co-orientadora a Professora Doutora Isabel Maria Cerqueira Lopes Alves (Médica Veterinária e Professora Associada no Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa). Teve início a 11 de Setembro de 2017 e terminou a 26 de Janeiro de 2018.

Durante o período de estágio no HEFMV foi realizada rotação pelos serviços de Medicina Interna, Internamento, Cirurgia, Imagiologia, Dermatologia, Oftalmologia, Neurologia, Oncologia, Unidade de Isolamento de Doenças Infecciosas e Urgência Noturna.

No Serviço de Medicina Interna teve a oportunidade de assistir e participar em várias consultas (profiláticas, de rotina, de acompanhamento, de primeira opinião, de segunda opinião e de referência) que abrangeram planos vacinais e de desparasitação, eutanásias e várias afeções do aparelho respiratório, gastrointestinal, urinário e reprodutor, e ainda do sistema nervoso e endócrino. Nestas consultas foi possível recolher a anamnese e fazer o exame físico do animal e, ainda, com a supervisão e opinião do clínico responsável, chegar a planos de diagnósticos diferenciais e de terapêutica adequados. Foram colocados em prática procedimentos médicos comuns que se realizam aquando das consultas, tais como vacinações, administração de medicação, colheita de sangue e de urina, medição da pressão arterial, cateterização endovenosa, entre outros. No internamento foi possível seguir diversos casos durante o tratamento e escolher os meios de diagnóstico complementares adequados a cada situação. Aqui, realizaram-se vários procedimentos nos animais internados como cateterização endovenosa e vesical, administração de medicação pelas várias vias, realização de pensos, abdominocentese e toracocentese, ressuscitação cardiopulmonar, entre outros. Na urgência noturna, assistiu o Médico e Enfermeiro Veterinários de serviço durante a noite, tanto na receção como na estabilização e acompanhamento de animais que recorriam ao serviço de urgência do HEFMV.

No serviço de Cirurgia competiu-lhe a receção e preparação pré-cirúrgica do animal, e a indução e monitorização da anestesia durante toda a cirurgia. Foi possível assistir a diversos tipos de cirurgias: de rotina (orquiectomias, ovariohisterectomias, nodulectomia, destartarizações e extrações dentárias), de especialidade (cirurgias ortopédicas e de tecidos moles) e de urgência, em pacientes críticos (ovariohisterectomia devido a piómetra, esplenectomia, gastropexia após torção gástrica, enterectomia, entre outras).

No serviço de Imagiologia participou tanto na realização e interpretação de radiografias e de tomografias computadorizadas como de ecografias abdominais e ecocardiografias. Nos serviços de Dermatologia, Oftalmologia e Neurologia assistiu e auxiliou consultas de referência destas especialidades, que são bastante metódicas e onde são utilizados testes específicos de diagnóstico. No serviço de oncologia seguiu doentes oncológicos durante o tratamento, tendo participado em sessões de quimioterapia e aprendido a manipular agentes quimioterápicos. Na Unidade de Isolamento de Doenças Infeciosas pôde aprender a lidar com animais com doenças infecto-contagiosas, minimizando o risco de disseminação das mesmas.

Para além destes serviços, seguiu os casos clínicos da área de Reprodução e Obstetrícia do HEFMV com a Professora Doutora Luísa Maria Freire Leal Mateus e acompanhou várias cadelas, durante o seu ciclo reprodutivo, no “Canil da Quinta das Tílias” em Palmela com o criador José Cansado. Aqui recolheu as amostras para a dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV).

Foi realizado, também, um estágio extracurricular em França, na École Nationale Vétérinaire d’Alfort (EnVA), no Centre d’Étude en Reproduction des Carnivores (CERCA), tendo como supervisora a Doutora Cindy Maenhoudt. Este estágio teve a duração de 2 meses (1 de Fevereiro a 30 de Março de 2018), tendo tido oportunidade de colocar em prática muitos dos conhecimentos adquiridos em Reprodução e Obstetrícia: inseminação artificial; colheita, avaliação e preservação de sémen; ecografia; vaginoscopia; exame clínico ginecológico e andrológico; cuidados de neonatologia; várias cirurgias do departamento (esterilizações, cesarianas, mastectomias, entre outras).

II. INTRODUÇÃO

A gestação na cadela é um período em que ocorrem várias alterações fisiológicas (Feldman & Nelson, 2004), que devem ser do conhecimento do Médico Veterinário para que não sejam julgadas como patológicas.

Dado que o intervalo entre o primeiro cruzamento e o parto pode variar entre 57 e 72 dias (Concannon, Whaley, Lein, & Wissler, 1983), a determinação precisa da data de parto é crucial para que haja uma correta monitorização da gestação, assim como uma ótima assistência aquando do parto, e torna-se particularmente importante quando é necessário planear uma cesariana eletiva.

Uma correta monitorização do estro permite determinar a data do pico de LH e a data da ovulação, que são utilizadas para prever, não só o período ideal para cobrição/inseminação, como também a data do parto (England & Concannon, 2002).

Este estudo teve como objetivos gerais:

1. Comparar parâmetros hematológicos e perfis das concentrações séricas de progesterona entre cadelas gestantes e não gestantes;
2. Avaliar a precisão da deteção da data do parto utilizando como referência o dia da primeira e da última inseminação artificial (IA), o dia do pico de LH e o dia de início do diestro citológico, e avaliar, também, a concentração sérica de progesterona antes do parto;
3. Avaliar o impacto da monitorização do proestro/estro na performance reprodutiva.

Por forma a minimizar a influência da raça e do manejo a que os animais estão sujeitos, foram utilizadas apenas cadelas da raça Retriever do Labrador, pertencentes a um só canil.

O trabalho realizado inseriu-se no projeto MIVM 9.2016: "Determination of parturition day in Labrador Retriever bitches using ultrasonographic fetometry as compared to hormonal and cytological methods". Este projeto foi financiado pelo Centro de Investigação Interdisciplinar de Sanidade Animal (CIISA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

Este trabalho deu origem a uma comunicação em forma de painel, a qual foi apresentada num Congresso Internacional da Especialidade:

R. Dourado; B. Soares; I. Alves; L. Mateus. **The accuracy of the LH peak and the onset of cytological diestrus on the prediction of parturition date in Labrador retriever bitches.** 21º Congresso da European Veterinary Society of Small Animal Reproduction (EVSSAR), 22 a 23 de Junho de 2018, Veneza, Itália (Anexo 2).

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Ciclo éstrico da cadela

O primeiro ciclo éstrico marca a puberdade na cadela, período a partir do qual adquire a capacidade de se reproduzir. Normalmente, ocorre após esta atingir dois terços do peso adulto, entre os 6 e os 14 meses de idade. A idade de início da puberdade está positivamente relacionada com o tamanho da cadela. Assim, cadelas de pequeno porte começam o primeiro ciclo éstrico entre os 6 e os 10 meses de idade, enquanto que as de grande porte podem atingir quase os 2 anos até tal acontecer (Concannon, 2011; Johnston, Kustritz, & Olson, 2001)

O termo “cio” é utilizado de forma comum, pelos criadores e tutores, e corresponde ao período do ciclo éstrico da cadela em que há manifestação de sinais clínicos (proestro e estro) (Romagnoli & Lopate, 2017).

No primeiro ciclo éstrico é comum as cadelas apresentarem um cio interrompido (comportamento de “cio” com ausência de ovulação) ou um cio silencioso (ovulação com ausência de sinais característicos de “cio”) (Johnston et al., 2001). A primeira cobrição está recomendada aquando do segundo ou terceiro ciclo éstrico, ou a partir dos 2 anos de idade (Feldman & Nelson, 2004).

A cadela é uma fêmea monoéstrica não sazonal, pode apresentar um a três ciclos éstricos por ano e exibir “cio” ou parir em qualquer altura do ano (Concannon, 2011; Romagnoli & Lopate, 2017). Os intervalos entre dois ciclos éstricos são variáveis, com diferenças entre raças, entre cadelas da mesma raça e até na mesma cadela. Normalmente, o intervalo é de 6 a 7 meses, não havendo uma diferença significativa entre cadelas gestantes e não gestantes (Concannon, 2011).

O ciclo éstrico divide-se em 4 fases: proestro, estro, diestro e anestro (Concannon, 2011; Feldman & Nelson, 2004; Johnston et al., 2001; Romagnoli & Lopate, 2017). São utilizados vários métodos para classificar as fases do ciclo éstrico, baseados nas alterações comportamentais, clínicas, fisiológicas, citológicas e endócrinas que ocorrem na cadela (Johnston et al., 2001).

1.1 Proestro

O início do proestro é marcado pelo aparecimento de alterações clínicas ligadas ao aumento das concentrações de estrogénio, nomeadamente edema e turgidez da vulva e corrimento vulvar sero-sanguinolento (Concannon, 2011; Johnston et al., 2001).

Esta fase é a primeira do ciclo éstrico e dura em média 9 dias, mas pode variar de 2 a 27 dias (Bell & Christie, 1971). Durante este período a fêmea atrai o macho mas não está recetiva ao

cruzamento, podendo ser agressiva caso este tente a cópula. A atração deve-se à libertação de feromonas sexuais, provenientes do corrimento vulvar, de secreções do saco anal e da urina (Johnston et al., 2001).

Nesta fase, há um aumento progressivo do edema e da turgidez da vulva, do edema da mucosa vaginal, da proliferação e cornificação do epitélio vaginal, e do número de células epiteliais na citologia vaginal (Concannon, 2011). O aumento do número de camadas de células do epitélio da mucosa vaginal diminui a sua fragilidade e assim previne possíveis traumatismos provocados pela cópula (Feldman & Nelson, 2004).

Através da vaginoscopia é possível observar a mucosa vaginal edemaciada com as pregas redondas, edematosas e lisas, devido ao efeito de retenção de água no espaço intersticial provocado pelos estrogénios (Concannon, 2011; Feldman & Nelson, 2004).

A citologia vaginal no início do proestro é caracterizada pela presença de eritrócitos e por uma dominância de células parabasais e de células intermédias com citoplasma pequeno. Com o avançar do proestro, a percentagem de células parabasais diminui e aumenta a percentagem de células intermédias (com citoplasma grande) e de células superficiais queratinizadas. Apesar da presença de eritrócitos ser normal no proestro, estes podem estar em número reduzido ou até ausentes. Também, podem ser encontradas bactérias e neutrófilos, e estes últimos desaparecem gradualmente e estão mesmo ausentes no estro (Johnston et al., 2001; Wright & Parry, 1989).

No fim do anestro há um aumento da secreção pulsátil da hormona luteinizante (LH), causada pelo aumento da secreção pulsátil da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH). O aumento pulsátil de LH é um dos fatores que induz o início do proestro. Neste período, há um aumento concomitante, mas mais discreto, da hormona folículo estimulante (FSH) (Concannon, 2009).

Desde meio até ao final do proestro, a concentração de LH e de FSH diminuem para níveis próximos do nadir, devido ao *feedback* negativo provocado pelos níveis elevados de estrogénio sérico, e os folículos tornam-se potencialmente autónomos ou semiautónomos (Concannon, 2009).

A concentração sérica de estrogénio (estradiol-17 β) aumenta de 5-15 pg/mL (anestro) até concentrações de 40-120 pg/mL (média de 70 pg/mL) no final do proestro (Concannon, 2011). A concentração de progesterona mantém-se basal (< 1 ng/mL) até ao final do proestro, altura em que começa a aumentar (Johnston et al., 2001). Este aumento está relacionado com a luteinização pré-ovulatória da parede dos folículos (Concannon, Hansel, & Mcentee, 1977). A luteinização folicular pode começar a ser observada 6 dias antes do pico de LH, e reflete-se no aumento lento dos valores basais de progesterona, que passam de 0,2-0,4 ng/mL para os níveis de 0,6-1,0 ng/mL (Concannon, 2009). Há também um aumento dos níveis séricos de testosterona, no entanto, é possível que esta seja apenas um derivado da progesterona durante a esteroidogénese (Feldman & Nelson, 2004).

O final do proestro, ou seja, início do estro, corresponde ao início do comportamento de aceitação da cópula por parte da fêmea, ocorrendo 0,5 a 3 dias depois do pico de estrogénio e ± 1 dia do pico de LH. Em termos endócrinos, o proestro acaba quando ocorre o pico de LH (Concannon, 2011).

1.2 Estro

O estro é a fase do ciclo éstrico em que a fêmea aceita e mostra-se interessada no macho, permitindo a cópula. Este comportamento inicia-se após a diminuição da concentração sérica de estrogénio, concomitantemente com o aumento da concentração sérica de progesterona. Apesar dos estrogénios, isoladamente, conseguirem induzir o comportamento sexual da cadela, a progesterona aumenta e sincroniza este comportamento (Concannon, 2011; Feldman & Nelson, 2004; Johnston et al., 2001).

O reflexo de cauda, em que a cadela desvia a cauda sempre que se toca na zona perivulvar, é um dos sinais observados. Ocasionalmente, há cadelas que se mantêm não recetivas durante todo o estro, apesar de não apresentarem qualquer tipo de afeção (Romagnoli & Lopate, 2017).

Outro evento importante nesta fase é o *feedback* positivo exercido no hipotálamo e hipófise, provocado pela elevada concentração de estrogénio sérico, que resulta na secreção de FSH e, mais relevante, de LH no início do estro (Feldman & Nelson, 2004).

Apesar das alterações hormonais, citológicas, clínicas e de comportamento serem típicas desta fase, muitas vezes não ocorrem em simultâneo. Nalgumas cadelas o início do estro comportamental pode ocorrer mais cedo, isto é, 2 a 3 dias antes do pico de LH, enquanto noutras pode ocorrer mais tarde, isto é, 4 a 6 dias depois do pico de LH (Concannon, 2011; Johnston et al., 2001).

Esta fase dura em média 9 dias, podendo variar de 4 a 24 dias (Bell & Christie, 1971). Durante este período, a vulva continua edemaciada mas perde a turgidez, estando mais flácida ao toque do que no proestro. O corrimento vulvar contém menos sangue do que no proestro, no entanto, há cadelas que mantêm o corrimento sero-sanguinolento durante o estro (Johnston et al., 2001).

A nível citológico, o estro inicia-se quando mais de 80% das células do epitélio vaginal presentes no esfregaço são células superficiais queratinizadas. Normalmente este índice de queratinização das células do epitélio vaginal é superior a 90% e atinge frequentemente os 100%. O fundo típico das citologias vaginais de estro é “limpo”, desprovido de muco e restos celulares. Os neutrófilos estão ausentes e o número de eritrócitos, normalmente, é menor, comparativamente ao observado na citologia vaginal de proestro. No entanto, os eritrócitos podem ser observados até ao início do diestro em muitas cadelas. A presença de bactérias na ausência de neutrófilos é considerada normal (Johnston et al., 2001; Wright & Parry, 1989).

No estro, a mudança da secreção de estrogénios para a secreção de progesterona, por parte dos folículos pré-ovulatórios, reduz a vascularização e o edema da mucosa vaginal, o que provoca uma alteração marcada do seu aspeto. Através da vaginoscopia, é possível observar que a mucosa vaginal se torna progressivamente mais enrugada ou crenulada. A crenulação máxima, marcada por pregas da mucosa vaginal enrugadas com bordos angulosos, ocorre entre a ovulação e a maturação dos oócitos, 2 a 5 dias depois. Aproximadamente, no final do estro, a mucosa vaginal volta a tornar-se flácida (Concannon, 2011; Feldman & Nelson, 2004). Em termos endócrinos, o estro é um período em que a concentração sérica de estrogénio continua a diminuir (até atingir valores intermédios de 10-20 pg/mL), a concentração sérica de progesterona aumenta progressivamente e a LH apresenta uma secreção pulsátil (com 12-24 horas de duração) (Feldman & Nelson, 2004).

As concentrações de LH aumentam para valores de 4-40 ng/mL no período pré-ovulatório, 1 a 3 dias após o pico na concentração de estrogénio. A concentração de FSH também está aumentada, observando-se um pico da concentração de FSH, que ocorre 0,5 a 1 dia após o pico da concentração de LH (Concannon, 2009).

A concentração sérica de progesterona começa a aumentar (para valores > 1 ng/mL) 24 a 48h antes do pico pré-ovulatório de LH, atingindo concentrações de 2 a 3 ng/mL na altura do pico de LH. No momento da ovulação, espontânea na cadela, que ocorre 24 a 72 horas depois do pico de LH, a concentração sérica de progesterona está, normalmente, entre os 4 a 10 ng/mL. Esta concentração continua a aumentar durante todo o estro até à terceira semana de diestro (Feldman & Nelson, 2004; Kutzler, Mohammed, Lamb, & Meyers-Wallen, 2003).

1.3 Diestro

O diestro é caracterizado pela persistência do corpo lúteo (CL) e por concentrações de progesterona elevadas. Esta fase termina quando a concentração sérica de progesterona volta a níveis basais (< 1,0 ng/mL) e tem a duração média de 56 a 58 dias nas cadelas gestantes, e de 60 a 80 dias nas não gestantes. A diferente duração do diestro deve-se ao facto do CL nas fêmeas não gestantes ter um tempo de vida funcional maior do que nas gestantes (Concannon, 2011; Hoffmann, Büsges, Engel, Kowalewski, & Papa, 2004; Johnston et al., 2001; Kowalewski, 2014).

Todas as cadelas saudáveis não gestantes em diestro são consideradas “pseudogestantes”, na medida em que todas têm um CL funcional, independentemente da presença de um feto (Feldman & Nelson, 2004).

O início do diestro é definido melhor por citologia vaginal do que através das alterações comportamentais e clínicas (Johnston et al., 2001). As alterações comportamentais e clínicas que marcam o começo desta fase são: a recusa do cruzamento com o macho, o fim da atração pelo macho e o retorno da vulva ao tamanho e firmeza normal (Feldman & Nelson, 2004).

A citologia vaginal é caracterizada por uma diminuição acentuada da percentagem de células superficiais queratinizadas e por um aumento da percentagem de células intermédias com citoplasma pequeno e de células parabasais. Os neutrófilos reaparecem e estão normalmente presentes em grande número nos primeiros dias de diestro. Podem ser observadas células de metaestro, as quais são células intermédias que possuem neutrófilos no citoplasma, o que reflete o papel fagocitário das células do epitélio vaginal. Os eritrócitos podem estar presentes no início do diestro, o que dificulta a diferenciação do proestro e do diestro com base numa única citologia vaginal. Citologicamente, o diestro tardio é caracterizado por um reduzido número de células parabasais e intermédias com citoplasma pequeno, podendo aparecer núcleos de células sem citoplasma. Um número reduzido de neutrófilos pode estar presente (Johnston et al., 2001; Wright & Parry, 1989).

O início do diestro citológico foi definido, por Holst & Phemister (1974), como o primeiro dia em que o número de células superficiais queratinizadas diminui em pelo menos 20%. Contudo, muitas vezes a diminuição é maior que 50%. Geralmente ocorre cerca de 3 dias antes do fim do estro comportamental, 2 a 5 dias após a maturação dos oócitos, 5 a 7 dias após a ovulação e 8 a 9 dias após o pico de LH (Holst & Phemister, 1974, citado por Johnston et al., 2001).

A concentração sérica de progesterona, durante esta fase, continua a aumentar até atingir valores de 15 a 80 ng/mL, entre os dias 20 a 35 pós-ovulação. Seguidamente, começa a diminuir progressivamente, até atingir concentrações inferiores a 1 ng/mL entre os dias 55-90 pós-ovulação (70 dias, em média). A concentração sérica de estrogénio encontra-se em valores intermédios de 15 a 30 pg/mL, tendo um perfil semelhante ao da progesterona, com concentrações mais elevadas a meio do diestro, que decrescem no diestro tardio (Concannon, 2011).

A concentração sérica de LH aumenta no final do diestro, tanto em cadelas gestantes como em cadelas não gestantes. A concentração sérica de prolactina aumenta 2 a 3 vezes no diestro tardio, quando comparada com a concentração observada no início do diestro (Johnston et al., 2001).

1.4 Anestro

O anestro é uma fase quiescente do ciclo éstrico da cadela, quando classificada com base nas alterações comportamentais e clínicas (Johnston et al., 2001). Em cadelas gestantes o seu início é marcado pelo parto, porém, em cadelas não gestantes, é difícil identificar o início desta fase, pois não há alterações fisiológicas marcadas entre o fim do diestro e o início do anestro (Feldman & Nelson, 2004). Assim, o início do anestro depende do critério utilizado para definir o fim da fase lútea (Okkens & Kooistra, 2006).

Esta fase termina quando se inicia o proestro, ou seja, um novo ciclo éstrico. A sua duração é variável, dependendo de vários fatores: raça, estado de saúde, idade, ambiente, entre

outros. Normalmente, dura entre 2 a 10 meses, e durante este período o útero involui (Feldman & Nelson, 2004).

A citologia vaginal é caracterizada por um reduzido número de células parabasais e intermédias com citoplasma pequeno, podendo aparecer núcleos de células sem citoplasma. A presença de neutrófilos não é um achado comum (Johnston et al., 2001; Wright & Parry, 1989).

Este período é ativo, do ponto de vista endócrino. As concentrações séricas de LH aumentam, de forma pulsátil, no final do anestro, sendo talvez este o mecanismo que desencadeia o início do proestro. As concentrações séricas de FSH durante o anestro são elevadas, atingindo no anestro tardio níveis de magnitude semelhante aos observados no período pré-ovulatório (Concannon, 2009; Feldman & Nelson, 2004; Johnston et al., 2001).

As concentrações séricas de LH e FSH estão aumentadas em cadelas esterilizadas, quando comparadas com cadelas inteiras em anestro (Feldman & Nelson, 2004; Johnston et al., 2001).

A concentração de estrogénio sofre variações durante o anestro, o que se assume ser devido ao aparecimento de ondas de desenvolvimento folicular, que são de natureza subclínica e de curta duração (Feldman & Nelson, 2004). Mas, geralmente, esta concentração encontra-se entre 5-10 pg/mL (Concannon, 2011). Em contraste, a progesterona permanece em concentrações basais durante todo o anestro (Feldman & Nelson, 2004).

2. Momento ideal para a cobrição/inseminação das cadelas: métodos utilizados para detetar o dia da ovulação

Nas cadelas existem variações consideráveis no dia da ovulação, em relação ao início dos sinais clínicos. Este facto não é percebido pelos criadores que, frequentemente, impõem datas fixas de cobrição com base no primeiro dia de corrimento vulvar. Assim, muitas cadelas são cobertas/inseminadas em datas erradas, o que constitui a causa mais comum de infertilidade aparente na cadela (England & Concannon, 2002).

A determinação do dia da ovulação é recomendada para minimizar o número de cruzamentos/inseminações necessários, maximizar a utilização dos machos, reduzir o volume de sémen utilizado em cadelas predispostas à endometrite, melhorar as taxas de conceção, maximizar o tamanho da ninhada e permitir a determinação da data do parto (Romagnoli & Lopate, 2017).

Nesta espécie, os oócitos ovulados são imaturos (oócitos primários), os quais após maturação se transformam em oócitos secundários, que podem ser fertilizados. Este processo demora cerca de 48h, ocorrendo 2 a 3 dias após a ovulação e 4 a 5 dias depois do pico de LH (England & Concannon, 2002).

O período de fertilização corresponde ao período em que existem oócitos secundários no oviduto, capazes de serem fertilizados pelos espermatozóides. Normalmente, é o intervalo de dia 4 a dia 7, após o pico de LH (England & Concannon, 2002).

O período fértil é o intervalo de tempo em que um cruzamento ou inseminação pode resultar numa gestação. Este depende não só da cadela, mas também da qualidade do sémen do macho utilizado, e pode estender-se desde 3 dias antes do pico de LH até 7 dias depois do pico de LH (England & Concannon, 2002).

A altura ideal para a cobertura/inseminação da cadela é no começo do período de fertilização, 2 a 3 dias depois do dia da ovulação (4 a 5 dias após o pico de LH), para permitir a capacitação dos espermatozóides, que ocorre dentro do trato reprodutivo da cadela. Quando é possível mais do que um cruzamento/ inseminação, estes devem ser espaçados 2 dias entre si (England & Concannon, 2002).

A determinação do dia da ovulação é bastante importante, especialmente quando se quer usar sémen refrigerado ou congelado, pois este tem um tempo de sobrevivência inferior no trato reprodutivo da cadela. Podem ser utilizadas várias técnicas para detetar a ovulação na cadela: alterações clínicas, citologia vaginal, vaginoscopia, ecografia dos ovários, análises hormonais, entre outras. A combinação de várias técnicas permite obter os melhores resultados (England & Concannon, 2002; Kustritz, 2012; Lévy & Fontbonne, 2007; Romagnoli & Lopate, 2017).

2.1 Alterações clínicas

Como descrito anteriormente, existe um conjunto de alterações clínicas e comportamentais que marcam o início do proestro e a transição de proestro para estro. Uma das formas utilizadas para prever o dia do cruzamento, muito utilizada pelos criadores, é a contagem dos dias desde o início do proestro ou do início do estro comportamental (England & Concannon, 2002).

Em média, a ovulação ocorre 12 dias após o início do proestro. No entanto, este intervalo é variável, podendo variar entre 5 a 30 dias. Assim, cruzar a cadela entre o dia 12 e o dia 14, que é prática comum entre os criadores, é um método muito falível (England & Concannon, 2002).

Outro método, usado frequentemente pelos criadores, assumindo que o aparecimento dos sinais característicos de estro coincide com o pico de LH, é cruzar a fêmea 3 a 4 dias depois deste dia (England & Concannon, 2002).

Porém, o começo do estro endócrino tem uma fraca correlação com a manifestação de sinais de estro (estro comportamental), que podem aparecer de forma rápida e muito marcada nalgumas cadelas, e noutras de forma lenta, intermitente e dúbia (Concannon, 2011).

Deste modo, usar a data de início de estro, com base no comportamento e nos sinais clínicos da cadela, para determinar o dia da ovulação é um método pouco preciso, e não está aconselhado (England & Concannon, 2002).

2.2 Citologia vaginal

A citologia vaginal permite a avaliação da proporção entre os diferentes tipos de células do epitélio vaginal presentes nos esfregaços. Deste modo, pode ser utilizada para reconhecer a fase do ciclo éstrico e para estimar, retrospectivamente, o dia da ovulação e, prospectivamente, o dia do parto. O aumento da concentração de estrogénio durante o proestro provoca um aumento do índice de queratinização das células do epitélio vaginal (percentagem de células superficiais queratinizadas presentes no esfregaço) (England & Concannon, 2002; Wright & Parry, 1989). No entanto, a altura do índice máximo de queratinização das células do epitélio vaginal é variável nas cadelas, sendo impossível usar tal parâmetro para prever o pico de LH ou o momento da ovulação (Johnston et al., 2001).

A avaliação de vários esfregaços seriados, em vez de um único pontual, permite ao Médico Veterinário verificar se o ciclo éstrico está a progredir normalmente. Esta avaliação deve ser continuada até ao início do diestro citológico de modo a estimar, retrospectivamente, o dia da ovulação e verificar se o cruzamento/inseminação foi realizado na altura correta, que idealmente deve ocorrer 2 a 4 dias antes (England & Concannon, 2002; Johnston et al., 2001). A citologia vaginal é um método prático e útil, o qual evita que se recorra ao doseamento da LH ou da progesterona demasiado cedo. Estes doseamentos são mais dispendiosos e apenas devem ser iniciados quando se atinge um índice de queratinização de 80% (England & Concannon, 2002).

2.3 Vaginoscopia

A vaginoscopia destina-se a observar as pregas da mucosa vaginal, de modo a avaliar a superfície, o contorno, a cor e algum tipo de corrimento presente. Existe uma mudança marcada no aspeto da mucosa vaginal na transição de proestro para estro, devido à diminuição da concentração de estrogénio. Aproximadamente na altura do pico de LH, as pregas da mucosa vaginal começam a ficar enrugadas ou crenuladas e esta torna-se cada vez menos rosada, adotando uma coloração branca/creme. O período de fertilização corresponde à altura de máxima crenulação da mucosa vaginal, pelo que os cruzamentos/inseminações devem ser planeados para esta altura, isto é, cerca de 4 dias após o início da crenulação das pregas da mucosa vaginal (England & Concannon, 2002; Lindsay & Concannon, 1986).

2.4 Avaliação ecográfica dos ovários

Os folículos ováricos são observados à ecografia como estruturas anecogénicas, que aumentam de diâmetro durante o proestro. No fim do proestro medem cerca de 5 mm de diâmetro, atingindo o tamanho máximo de 7 a 10 mm de diâmetro, entre o dia do pico de LH e o dia da ovulação. O dia da ovulação pode ser determinado através da realização de ecografias diárias, no qual se deteta uma diminuição no número de folículos ou o seu desaparecimento. Cerca de 1 a 3 dias após a ovulação há um reaparecimento de estruturas anecogénicas no ovário, que corresponde ao início do desenvolvimento do corpo hemorrágico (Yeager & Concannon, 1996).

2.5 Análises hormonais

O doseamento de LH e de progesterona permitem com maior precisão detetar o dia da ovulação. Em teoria, a avaliação da concentração plasmática de LH é o método ideal. No entanto, para determinar o pico de LH é necessário retirar sangue à cadela 2 vezes por dia, todos os dias, pois a duração deste pico é relativamente curta. Na maioria dos países não existem testes (*kits*) rápidos para dosear a concentração de LH canino no consultório, consequentemente, é necessário enviar para laboratório, o que se torna pouco prático, mais demorado e caro (England & Concannon, 2002; Kustritz, 2012; Lévy & Fontbonne, 2007).

O doseamento da concentração de progesterona é o método mais utilizado para detetar o dia da ovulação na cadela. Devido à luteinização pré-ovulatória há um aumento da concentração sérica de progesterona, que pode ser usado para inferir o dia do pico de LH e da ovulação (Concannon et al., 1977a; Kustritz, 2012; Lévy & Fontbonne, 2007).

Como o aumento inicial de progesterona é progressivo, só é necessário colher sangue a cada 2 ou 3 dias. Quanto menos frequentes forem as análises, menos precisa irá ser a estimativa do dia do pico de LH e do dia da ovulação. Os cruzamentos/inseminações devem ser planeados entre os 4 a 6 dias após as concentrações séricas de progesterona atingirem, ou ultrapassarem, 2,0 ng/mL (England & Concannon, 2002).

Foi demonstrado que a concentração sérica de progesterona varia entre 2-3 ng/mL durante o pico de LH, e entre 4-10 ng/mL durante a ovulação (Kutzler et al., 2003).

A concentração de progesterona pode ser avaliada no consultório usando *kits* rápidos ou enviando as amostras para o laboratório. Os métodos laboratoriais disponíveis são por radioimunoensaios (RIA) ou por imunoensaios, por exemplo por quimioluminescência (CLIA). Estes métodos são quantitativos (England & Concannon, 2002; Kustritz, 2012). A CLIA foi validada para medir a concentração sérica de progesterona na espécie canina e tem a vantagem de ser mais segura, rápida e suficientemente precisa (Kutzler et al., 2003). Chapwanya et al. (2008) comparam estes dois métodos (CLIA e RIA) e demonstraram que

existe uma boa correlação entre os dois, quando se analisa a mesma amostra. As concentrações de progesterona obtidas por CLIA foram, em média, 0,69 ng/mL superiores, um valor que os autores não consideraram significativo (Chapwanya et al., 2008).

Vários *kits* rápidos, baseados em ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), estão comercializados. Estes *kits* são menos precisos do que os anteriores (RIA, CLIA) e, como são testes semi-quantitativos, devem ser feitos com mais regularidade. A única vantagem é a rapidez dos resultados, uma vez que podem ser usados no consultório, estando os resultados disponíveis aquando da consulta (England & Concannon, 2002; Kustritz, 2012).

Depois de se atingir os valores compatíveis com o dia da ovulação (4 -10 ng/mL) deverão ser feitos doseamentos posteriores para avaliar se a concentração de progesterona continua a aumentar, principalmente em casos de suspeita de anomalias no perfil de progesterona (Kustritz, 2012).

2.6 Outros métodos em estudo

Outros métodos diferentes têm sido investigados, os quais passam pela avaliação das alterações na resistência à passagem de corrente elétrica através do muco vaginal, das alterações de concentração de glucose no corrimento vaginal, das alterações de concentração de progesterona na saliva e, ainda, da cristalização do corrimento vaginal ou da saliva em lâminas de vidro. Apesar de existirem algumas correlações entre estas alterações e alterações fisiológicas na cadela, nenhuma das últimas três técnicas é suficiente para prever o dia da ovulação (Kustritz, 2012).

Nas cadelas observa-se um aumento da resistência à passagem de corrente elétrica através do muco vaginal durante o período fértil. Porém, os resultados de um estudo sugerem que este não é um método preciso, quando usado isoladamente, para determinar a melhor altura para cobrir a cadela. Ressalte-se que a precisão não melhorou mesmo quando utilizado em combinação com os outros métodos (análise da concentração sérica de progesterona, citologia vaginal, vaginoscopia) (Bergeron et al., 2014).

3.Gestação na cadela: alterações clínicas e laboratoriais

A gestação na cadela pode ser dividida em 3 períodos: (1) período de fertilização e do desenvolvimento embrionário precoce, que se estende desde a fertilização até aos dias 20 a 22 depois do pico de LH, altura em que ocorre a implantação; (2) período do desenvolvimento embrionário tardio, que dura desde a implantação até ao início da ossificação fetal, por volta dos 40-42 dias após o pico de LH; (3) período fetal, que se inicia com a ossificação e termina no parto (revisto por Verstegen-Onclin & Verstegen, 2008). A manutenção da gestação na

cadela depende da secreção de progesterona (>2 ng/mL), sendo os ovários (CL) a única fonte desta hormona (Johnston et al., 2001).

A fertilização ocorre no oviduto. A mórula evolui para blastocistos, ainda no oviduto, que migram para o útero antes do dia 16-20 após o pico de LH. Segue-se um período em que os blastocistos permanecem livres no lúmen uterino, até que, por mecanismos ainda mal conhecidos, se fixam ao endométrio, aproximadamente 17 a 19 dias depois do pico de LH. A implantação (invasão do endométrio pelo trofoblasto) ocorre por volta dos dias 20-22 após o pico de LH. A placenta que começa a ser formada é classificada como zonária, do tipo endotélio-corial (Feldman & Nelson, 2004). Até ao décimo dia de gestação, a função do CL não é afetada por tratamentos com fármacos luteolíticos (agonistas da dopamina, antagonistas da GnRH ou prostaglandinas), nem pela hipofisectomia (revisto por Verstegen-Onclin & Verstegen, 2008).

No período de desenvolvimento tardio, o CL torna-se sensível aos fármacos luteolíticos ou a outros fatores que interfiram, direta ou indiretamente, com a sua função. A organogénese é um período de grande sensibilidade a agentes externos, podendo ocorrer morte embrionária. A reabsorção embrionária não é, geralmente, detetada clinicamente (revisto por Verstegen-Onclin & Verstegen, 2008).

No último período os fetos já se encontram bem desenvolvidos e ossificados, e os seus pesos corporais aumentam drasticamente e exponencialmente. O CL encontra-se dependente do suporte hipofisário (prolactina e LH) e qualquer mudança no equilíbrio endócrino pode levar à perda de função do CL e, conseqüente, ao aborto com expulsão dos fetos mortos (revisto por Verstegen-Onclin & Verstegen, 2008).

A duração da gestação varia consideravelmente, dependendo do marco fisiológico ou comportamental que se considera como "dia 0" (Johnston et al., 2001). Tendo como base a data do primeiro cruzamento, o tempo de gestação pode variar entre 57 e 72 dias (Concannon, Whaley, Lein, & Wissler, 1983). Tendo como base a data do pico de LH e da ovulação, a duração da gestação é, aproximadamente, de 65 dias ou de 63 dias, respetivamente (Concannon et al., 1983), e é, em média, de 57 dias se for calculada a partir do início do diestro citológico (Concannon, 2000).

Durante este período a cadela passa por várias alterações: clínicas, hematológicas, bioquímicas e endócrinas. Estas alterações fisiológicas devem ser do conhecimento do Médico Veterinário para que não sejam julgadas como patológicas (Feldman & Nelson, 2004; Johnston et al., 2001; Romagnoli & Lopate, 2017).

Os mecanismos endócrinos presentes na regulação da função reprodutiva do cão doméstico (*Canis familiaris*) diferem, marcadamente, daqueles conhecidos noutras espécies. Alguns dos eventos, como, por exemplo, a não ocorrência de luteólise na ausência de gestação, resulta num perfil de função lútea similar ao da gestação. Consequentemente, o doseamento de

progesterona não permite identificar se a fêmea está ou não gestante (Kowalewski, Gram, Kautz, & Graubner, 2015).

3.1 Aspetos clínicos

Entre os 20 e os 30 dias de gestação é possível detetar, através da palpação abdominal, umas pequenas dilatações ovais no útero, que correspondem às zonas de implantação dos embriões. Aos 30-35 dias o útero está aumentado de forma difusa e os cornos uterinos encontram-se numa posição mais ventral, ficando as porções craniais destes dentro da arcada costal. Este facto torna a palpação individual das vesículas mais difícil nesta fase e pode resultar nalgum desconforto para a cadela. Depois dos 50 dias de gestação a palpação individual dos fetos pode ser realizada novamente (Feldman & Nelson, 2004).

O peso corporal da cadela aumenta, em média, 36% (20-50%) durante a gestação. Este aumento é mais significativo na segunda metade da gestação (Concannon, 1986). O desenvolvimento glandular do tecido mamário é mais evidente na segunda metade da gestação (Feldman & Nelson, 2004). O início da lactação, correlacionado com a diminuição da concentração sérica de progesterona e aumento acentuado da concentração sérica de prolactina, ocorre próximo do parto (na última semana de gestação) ou no momento do parto (Johnston et al., 2001).

3.2 Parâmetros hematológicos

Na cadela gestante o hematócrito diminui após a implantação, atingindo valores de 40% no dia 35 de gestação, e inferiores a 35% no final desta. A concentração de hemoglobina também diminui durante a gestação. A anemia gestacional deve-se, em parte, aos efeitos da hemodiluição provocada pelo aumento do volume plasmático. O volume sanguíneo total aumenta com o aumento do peso corporal, de 20 para 55% ao longo da gestação (Concannon & Lein, 1989, citado por Mshelia, Amin, & Chaudhari, 2005). A diminuição no tempo de vida dos eritrócitos em animais gestantes poderá também contribuir para a anemia gestacional (Dimço, Abeshi, Lika, & Dharmo, 2013).

Dimço et al. (2013) referem um aumento no número de leucócitos circulantes nas cadelas gestantes, devido a neutrofilia. Esta neutrofilia pode estar associada ao aumento das concentrações de estrogénio e cortisol. Os mesmos autores referem uma ligeira linfopenia, que poderá ser devida ao stress fisiológico da gestação (Dimço et al., 2013).

No entanto, alguns autores observaram uma diminuição do número de leucócitos em animais gestantes, que pode estar associada à imunossupressão, característica do período gestacional (Mshelia et al., 2005).

3.2 Parâmetros bioquímicos

As cadelas gestantes podem desenvolver hiperproteinémia e hipercolesterolémia. Nesta fase, ocorre um aumento da concentração sérica de proteínas de fase aguda, nomeadamente do fibrinogénio e da proteína C-reativa. Há também um aumento da atividade dos fatores de coagulação durante a gestação (Fatores VII, VIII, IX, e XI) (Feldman & Nelson, 2004; Johnston et al., 2001).

As concentrações de fibrinogénio e de proteína C-reativa aumentam por volta do dia 30 de gestação e mantêm-se elevadas, aproximadamente, até ao dia 50 de gestação. Nesta altura, as concentrações séricas destas proteínas começam a diminuir até ao parto (Feldman & Nelson, 2004). Observa-se, também, uma diminuição das proteínas totais e da albumina no fim da gestação e na altura do parto. Esta diminuição da albumina pode levar à diminuição do cálcio sérico (Johnston et al., 2001).

A gestação pode levar a uma hiperglicémia clínica ou subclínica, devida à insulino-resistência associada ao aumento da produção de hormona do crescimento (GH). Tal pode ocorrer também durante o diestro de cadelas não gestantes, pois a elevada concentração de progesterona estimula a secreção de GH. A insulino-resistência pode exacerbar um estado de diabetes mellitus pré-existente (revisto por Verstegen-Onclin & Verstegen, 2008).

3.3 Alterações endócrinas

Na cadela gestante, a placenta não contribui para a produção de progesterona, pelo que as concentrações séricas de progesterona são similares às observadas em cadelas não gestantes. Desta forma, é impossível utilizar a concentração de progesterona como um indicador de gestação. Todavia constata-se um aumento das concentrações de progesterona em fêmeas gestantes após os 25-30 dias (Concannon, 2011).

Nesta altura a concentração de progesterona está, normalmente, acima de 25 ng/mL, e nalgumas cadelas pode atingir valores de 50 a 90 ng/mL. Após um *plateau* de 7 a 15 dias, inicia-se uma diminuição progressiva até ao fim da gestação, verificando-se uma diminuição abrupta da sua concentração (para valores < 2 ng/mL) 24 a 48h antes do parto (Feldman & Nelson, 2004).

A manutenção do CL durante a gestação depende da secreção, por parte da hipófise, de hormonas luteotróficas (LH e prolactina) (Concannon, 1986).

A secreção pulsátil de LH aumenta na segunda metade da gestação; a concentração de FSH aumenta no final da gestação, podendo esta contribuir para o aumento das concentrações de estrogénio verificadas nessa altura (Feldman & Nelson, 2004).

A secreção de prolactina inicia-se nos dias 25-28 de gestação, estando significativamente elevada a partir do dia 32 (Concannon, 2011). Observa-se um pico na sua concentração 1 a

2 dias antes do parto, diminuindo depois por 36h, e voltando a aumentar em resposta à sucção dos cachorros (Feldman & Nelson, 2004; Johnston et al., 2001).

A relaxina é uma hormona produzida pela unidade feto-placentária. Nas cadelas não gestantes, as concentrações são inferiores a 0,25 ng/mL durante todo o diestro, mas nas cadelas gestantes a deteção de relaxina é possível a partir dos dias 25-27. A sua concentração é máxima ($> 3,0$ ng/mL) a partir do meio da gestação e diminui na altura do parto. Deste modo, a relaxina é a única hormona que pode ser utilizada para diagnóstico de gestação tardio na cadela (Concannon, 2011; Feldman & Nelson, 2004; Johnston et al., 2001). A concentração de estrogénio aumenta no final da gestação mas, continua com valores inferiores aos da fase de proestro (< 20 ng/mL). Este aumento persiste até ao parto, altura em que a concentração de progesterona diminui. Este aumento na concentração de estrogénio, combinada com a diminuição de concentração de progesterona, leva ao aumento da síntese de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), que tem função luteolítica (Feldman & Nelson, 2004).

As concentrações de cortisol aumentam significativamente na altura do parto e continuam elevadas durante 12h, voltando para valores normais 36h depois do início do parto. Este aumento da concentração de cortisol materno reflete, provavelmente, o aumento da secreção fetal de cortisol (Veronesi et al., 2002).

As concentrações de tiroxina (T_4) e triiodotiroxina (T_3) podem estar mais baixas em cadelas gestantes (Feldman & Nelson, 2004).

4. Previsão da data do parto na cadela

A previsão da data do parto na cadela é essencial para que haja uma correta monitorização da gestação e uma ótima assistência aquando do parto. Este é um evento crítico, sendo que uma correta previsão da data permite ao Médico Veterinário e ao criador estarem preparados para assistir o parto, reduzindo o número de cachorros mortos em caso de distócia. A previsão da data do parto torna-se particularmente importante quando não se conhece a data do cruzamento e quando há um elevado risco de distócia e é necessário planear uma cesariana eletiva (Kim, Travis, & Meyers-Wallen, 2007).

Para estimar a data do parto na cadela estão disponíveis vários métodos, que podem ser utilizados em combinação. Quando há um planeamento da cobrição/inseminação da cadela, a data do pico de LH ou a data da ovulação são determinadas durante o estro e podem ser utilizadas para prever, com mais precisão, a data do parto. Quando o cruzamento já ocorreu, o primeiro dia de diestro citológico pode ser determinado e utilizado para prever a data do parto. Para além destes métodos, pode-se chegar à idade gestacional através dos achados ecográficos e radiográficos, e o início do parto pode ser previsto pela medição da concentração de progesterona e da temperatura retal ou vaginal (Michel, Spörri, Ohlerth, & Reichler, 2011).

4.1 Data dos cruzamentos ou inseminações

Na cadela, o tempo de gestação tendo como base a data do primeiro cruzamento não é um método preciso para determinar a data do parto. Neste caso, o tempo de gestação pode variar entre 57 e 72 dias, pois o período fértil na cadela pode ser de 10 dias e os espermatozóides são capazes de se manterem férteis no trato reprodutivo desta até aproximadamente 9 dias (Concannon et al., 1983). Com efeito, se uma cadela for submissa pode ser coberta pelo macho desde 3 a 5 dias antes do pico de LH. Assim, o intervalo entre o primeiro cruzamento e o parto pode ser de 69 a 70 dias. E, em casos raros, em que a cadela esteja ainda fértil 9 ou 10 dias após o pico de LH e é coberta, o intervalo entre o cruzamento e o parto pode ser de 55 ou 56 dias (Concannon, 2000).

4.2 Data do pico de LH e da ovulação

Existem vários métodos, já mencionados, para detetar o dia da ovulação na cadela. O tempo de gestação, calculado a partir do dia da ovulação (63 ± 1 dia) ou do pico de LH (65 ± 1 dia) é um método bastante preciso para determinar a data do parto (Concannon et al., 1983). No entanto, é importante salientar que intervalos de 63 e 67 dias, após o pico de LH e após a ovulação, respetivamente, já foram observados em algumas gestações normais e não complicadas, não devendo ser considerados fora do comum (Concannon, 2000).

4.3 Data do primeiro dia de diestro citológico

A data do parto é, em média, 57 dias após o início do diestro citológico (Concannon, 2000). Este método, que consiste em adicionar 57 dias à data de início do diestro citológico, para ser utilizado necessita que sejam feitos esfregaços vaginais diários. O primeiro dia de diestro citológico ocorre, aproximadamente, 6 dias após a ovulação (Holst & Phemister, 1974, citado por Johnston et al., 2001).

4.4 Imagiologia

A determinação da idade do embrião ou do feto pode ser baseada no aparecimento das estruturas embrionárias, fetais e extra-fetais, observadas na ecografia (Tabela 1) e na radiografia (Tabela 2) (Rendano, Lein, & Concannon, 1984; Yeager, Mohammed, Meyers-Wallen, Vannerson, & Concannon, 1992).

Tabela 1 - Idade gestacional, baseada na detecção ecográfica de estruturas embrionárias e fetais.

Estrutura embrionária/fetal	Dias após o pico de LH
Saco gestacional	20
Embrião com batimento cardíaco	23-25
Embrião com forma bipolar	25-28
Vesícula diencéfalo-telencefálica (DPTV)	25-31
Esqueleto	33-39
Feto com movimento	34-36
Bexiga	35-39
Estômago	36-39
Pulmões hiperecogênicos vs. Fígado	38-42
Fígado hiperecogênico vs. Abdômen	39-47
Rins	39-47
Intestino	57-63

(adaptado de Yeager et al., 1992)

Através da ecografia é possível: (1) determinar a idade gestacional (Tabela 1); (2) prever a data do parto com base em medições de estruturas extra-fetais ou fetais; (3) avaliar a viabilidade fetal, nomeadamente, medir a frequência cardíaca fetal (FCF) (revisto por Beccaglia, Alonge, Trovo', & Luvoni, 2016).

Tabela 2 - Detecção radiográfica de mineralização fetal na cadela.

Evento	Dias após o pico de LH	Dias antes do parto
Início da mineralização do esqueleto fetal (coluna vertebral, costelas e crânio)	45 (43-46)	21 (20-22)
Mineralização da escápula, do úmero e do fêmur	48 (46-51)	17 (15-18)
Mineralização do rádio, da ulna e da tíbia	52 (50-53)	11 (9-13)
Mineralização dos ossos pélvicos	54 (53-57)	11 (9-13)
Mineralização dos dentes	61 (58-63)	4 (3-8)

Os valores são médias (e variações) do dia em que os eventos indicados foram evidenciados pela primeira vez nas gestações estudadas por Rendano et al. (1984) (adaptado de Rendano et al., 1984).

As medições ecográficas de estruturas extra-fetais e fetais são um método comum e preciso para prever a data do parto, mesmo quando a data da ovulação é desconhecida. Durante a primeira metade da gestação (entre 19 e 37 dias após o pico de LH), as medidas do saco gestacional (diâmetro da cavidade coriônica (ICC) e diâmetro uterino externo (OUD)), ou a dimensão do feto (crown-rump length, CRL) podem ser avaliadas. Na segunda metade da gestação (> 37 dias), as medidas fetais, como o diâmetro biparietal (BP), o diâmetro corpo (BD) e o diâmetro da DPTV podem ser avaliadas (Luvoni & Beccaglia, 2006). A precisão máxima deste método é obtida quando se utilizam fórmulas específicas, tendo em consideração os diferentes tamanhos das cadelas (Alonge, Beccaglia, Melandri, & Luvoni, 2016; Beccaglia & Luvoni, 2012).

A FCF deve ser superior a 220 bpm (batimentos por minuto). Quando esta se encontra entre 180 e 220 bpm indica stress fetal moderado, e quando está inferior a 180 bpm indica stress fetal grave. Apesar do momento preciso na variação da FCF não ter sido ainda determinado, foi detetado que ocorre um aumento da FCF, aproximadamente, 72h antes do parto, e cerca de 6 horas a 1 hora antes do parto há uma diminuição acentuada da FCF, que passa de 200-220 bpm para 160-180 bpm. A monitorização ecográfica diária do feto, combinada com a avaliação das oscilações da FCF é considerado um dos melhores indicadores para prever o dia do parto (Gil, Garcia, Giannico, & Froes, 2014).

4.5 Diminuição da concentração sérica de progesterona

Na cadela, a concentração sérica de progesterona diminui, de forma abrupta, para valores inferiores a 2 ng/mL, 24 a 48h antes do parto (Veronesi et al., 2002). Recentemente foi demonstrado que, quando o método de determinação é o CLIA, o *cut-off* abaixo do qual é seguro fazer uma cesariana eletiva é de 3,4 ng/mL, em vez de 2 ng/mL determinados quando o método utilizado é o RIA (Rota, Charles, Starvaggi Cucuzza, & Pregel, 2015).

4.6 Monitorização da temperatura retal ou vaginal

A diminuição da temperatura retal na cadela, relacionada com a diminuição da concentração sérica de progesterona (hormona termogénica), é considerada um indicador prático para prever o parto. A temperatura retal diminui, abruptamente, pelo menos 1°C cerca de 14h depois da descida da concentração sérica de progesterona, voltando a aumentar à medida que a cadela entra na primeira fase do parto. A expulsão do primeiro cachorro ocorre 8 a 24h após a descida da temperatura retal. Os tutores/criadores devem começar a medir a temperatura retal da cadela 2 a 3 vezes ao dia, todos os dias, a partir dos 55 dias após o cruzamento (Johnston et al., 2001; Tsutsui & Murata, 1982).

A fiabilidade deste método é controversa, havendo estudos que demonstram que não existe uma diferença significativa na temperatura retal entre as 48h pré-parto e o parto (Veronesi et al., 2002).

Também é possível observar uma ligeira diminuição na temperatura vaginal da cadela cerca de 24h antes do parto, no entanto, a deteção desta diminuição não permite determinar com precisão o início do parto (Geiser, Burfeind, Heuwieser, & Arlt, 2014).

IV. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo utilizado neste estudo foi aprovado pelo Comité de Ética e Bem-Estar Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa).

1. População

Neste estudo foram utilizadas 26 cadelas da raça Retriever do Labrador (N = 26), 18 gestantes (G = 18) e 8 não gestantes (NG = 8), pertencentes ao “Canil da Quinta das Tílias”, situado em Palmela. A média de idades das cadelas em estudo foi de 3,2 anos (1 - 6 anos) e o peso médio foi de 34,43 kg (27,25 - 41,55 kg).

Entre Maio de 2017 e Maio de 2018 foi feito o seguimento do ciclo éstrico de cada cadela, tendo-se realizado citologias vaginais e colheitas de sangue seriadas, com o objetivo de determinar os dias ideais para inseminar. Para cada animal foram recolhidos dados no que diz respeito a idade, peso, data de início do corrimento vulvar, datas das IA e data do parto. Todas as fêmeas que o criador quis reproduzir foram submetidas a IA e foi feito o diagnóstico de gestação por ecografia, entre os 25 e os 35 dias após o pico de LH.

Por forma a avaliar o impacto da monitorização do ciclo éstrico na performance reprodutiva, foi feito um levantamento dos dados referentes aos partos registados nos anos de 2015/2016 e 2016/2017: datas de início de cio, datas das IA, nº de IA/cadela, datas de parto, prolificidade e fertilidade. Durante estes dois anos não houve monitorização da concentração sérica de progesterona nem se realizaram citologias vaginais durante o estro.

2. Colheita e análise de amostras

2.1 Citologia vaginal

Em todas as cadelas, e após deteção do corrimento sanguíneo vulvar, foram realizadas citologias vaginais seriadas durante o proestro, o estro e até ao início do diestro. Nas cadelas do grupo não gestante, fizeram-se ainda citologias vaginais aos 25-35 dias, 40-50 dias e 62-64 dias após o pico de LH, até ao início do anestro. No grupo gestante cessou-se a realização de citologias vaginais após o diagnóstico de gestação positivo.

O início do estro citológico foi definido pelo aparecimento de mais de 80% de células superficiais queratinizadas no esfregaço. O início do diestro citológico foi definido como o primeiro dia em que o número de células superficiais queratinizadas diminuiu em pelo menos 20% (Holst & Phemister, 1974, citado por Johnston et al., 2001).

As zaragatoas vaginais foram inseridas até ao fundo de saco vaginal e as citologias vaginais foram realizadas através de um esfregaço por aposição numa lâmina de vidro. Após secas,

as citologias foram coradas com Diff-Quick (MAIM S.L., Barcelona, Espanha). A análise foi realizada com base nas alterações quantitativas e qualitativas da população celular do epitélio vaginal (células basais/parabasais, células intermédias, células superficiais queratinizadas, neutrófilos, eritrócitos) (Johnston et al., 2001).

2.2 Amostras de sangue

As amostras de sangue foram colhidas para realização de hemograma em 4 períodos de tempo (no estro (T1), entre os 25-35 dias (T2), os 40-50 dias (T3) e os 61-63 dias (T4) após o pico de LH) e para doseamento de progesterona (no estro, entre os 25-35 dias, os 40-50 dias, os 61-63 dias pós pico de LH, e no início do anestro). As colheitas de sangue foram efetuadas na veia safena ou cefálica, alternando-se os membros utilizados.

2.2.1 Doseamento sérico de progesterona

As amostras de sangue (1 mL) foram colocadas em eppendorfs e deixadas a repousar durante 30 min à temperatura ambiente, sendo posteriormente centrifugadas (5 min x 13000 g). O soro foi processado imediatamente ou armazenado a -20°C em eppendorfs até ao seu posterior processamento. O doseamento de progesterona foi efetuado sem extração de amostra por quimioluminescência (Immulite 1000, Siemens Healthcare Diagnostics, Lda., Amadora, Portugal), utilizando um *kit* disponível comercialmente (Immulite 1000 Progesterone *Kit*, Siemens). O coeficiente de variação inter-ensaio para o controlo C1 (1,58 ng/mL), e C2 (5,1 ng/mL) variou entre 2-4% (K9 CON, Siemens). Este procedimento decorreu no Laboratório de Endocrinologia da FMV-ULisboa.

O dia do pico de LH foi considerado como o dia em que a concentração sérica de progesterona atingiu um valor superior a 1,5 ng/mL, seguido de um aumento para valores de 4,0-10,0 ng/mL nos dias seguintes. Este último intervalo (4,0-10,0 ng/mL) foi considerado como o período em que ocorre a ovulação (Kutzler et al., 2003).

2.2.2 Hemograma

As amostras de sangue foram colocadas em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) de 0,5 mL para realização de hemograma. Este procedimento decorreu no Laboratório Braço Forte, na FMV-ULisboa.

3. Avaliação da precisão de detecção da data do parto

A precisão de detecção da data do parto foi determinada utilizando como referência o dia do pico de LH, o dia da IA e o início do diestro citológico, ao qual foi adicionado 65 dias, 60 dias e 57 dias, respetivamente (Concannon, 2000; Concannon et al., 1983).

4. Análise estatística

Todos os registos foram inseridos numa base de dados. Recorreu-se ao programa informático Excel® (Microsoft® Office Excel 2010) como suporte de construção de gráficos e tabelas, bem como para a obtenção de estatística descritiva (média, erro-padrão, valor máximo e mínimo). A análise estatística foi realizada com recurso ao programa *Statistica for Windows* (Statistica 6.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA, 1995). A normalidade da distribuição dos dados de variáveis quantitativas foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk, tendo os dados sido transformados ($\log x + 1$). Os dados do hemograma foram analisados por MANOVA. Os efeitos significativos foram analisados e as médias comparadas pelo teste LSD. Os dados das concentrações de progesterona foram analisados por ANOVA. Os dados de variáveis qualitativas foram analisados com o teste exato de Fisher. O nível de significância escolhido foi de 5% ($p < 0,05$).

V. RESULTADOS

1. Avaliação do hemograma e das concentrações séricas de progesterona em cadelas gestantes e não gestantes

1.1 Hemograma

Com o objetivo de avaliar os efeitos da fase do ciclo éstrico e da gestação no hemograma, foram colhidas amostras de sangue periférico nas fases de estro (T1) e de diestro [25-35 dias (T2), 40-50 dias (T3) e 61-63 dias (T4) após o pico de LH] em fêmeas gestantes (n = 11) e não gestantes (n = 8). Os resultados dos diferentes componentes do eritrograma e do leucograma estão descritos nas Tabelas 3 e 4, respetivamente.

Tabela 3 - Valores médios (\pm erro padrão) do eritrograma, desde o estro até ao final do diestro (T1 a T4), no grupo das cadelas gestantes (n=11) e no grupo das cadelas não gestantes (n=8) da raça Retriever do Labrador.

Eritrograma	Grupo Gestante				Grupo Não gestante			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
Eritrócitos (x 10 ⁶ /μL)	6,88 ^a (0,16)	6,54 ^a (0,26)	6,51 ^a (0,31)	5,52 ^b (0,22)	7,40 ^a (0,23)	7,62 ^a (0,39)	7,22 ^{ab} (0,47)	6,92 ^b (0,33)
Hemoglobina (g/mL)	15,81 ^a (0,34)	14,91 ^a (0,58)	15,15 ^a (0,75)	12,88 ^b (0,55)	16,86 ^a (0,50)	17,42 ^{ab} (0,86)	16,74 ^a (1,11)	15,72 ^{ac} (0,81)
Hematócrito (%)	46,23 ^a (1,35)	41,84 ^a (2,34)	44,78 ^a (2,26)	36,87 ^b (1,84)	50,28 (2,00)	50,10 (3,48)	46,76 (3,36)	44,34 (2,73)
VCM (fL)	67,15 (1,11)	64,98 (1,24)	69,03 (2,05)	66,89 (2,14)	67,66 (1,65)	65,86 (1,83)	65,10 (3,04)	64,06 (3,17)
HCM (pg)	22,96 ^a (0,15)	22,83 ^a (0,16)	23,30 ^{bc} (0,19)	23,34 ^{ac} (0,17)	22,80 ^a (0,22)	22,86 ^{ab} (0,24)	23,20 ^b (0,28)	22,68 ^{ab} (0,26)
CHCM (g/dL)	34,30 (0,53)	33,58 (1,72)	34,05 (1,17)	35,30 (1,35)	33,78 (0,79)	34,78 (2,55)	36,10 (1,73)	35,78 (2,01)

Dentro de cada grupo, células com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$) (MANOVA)

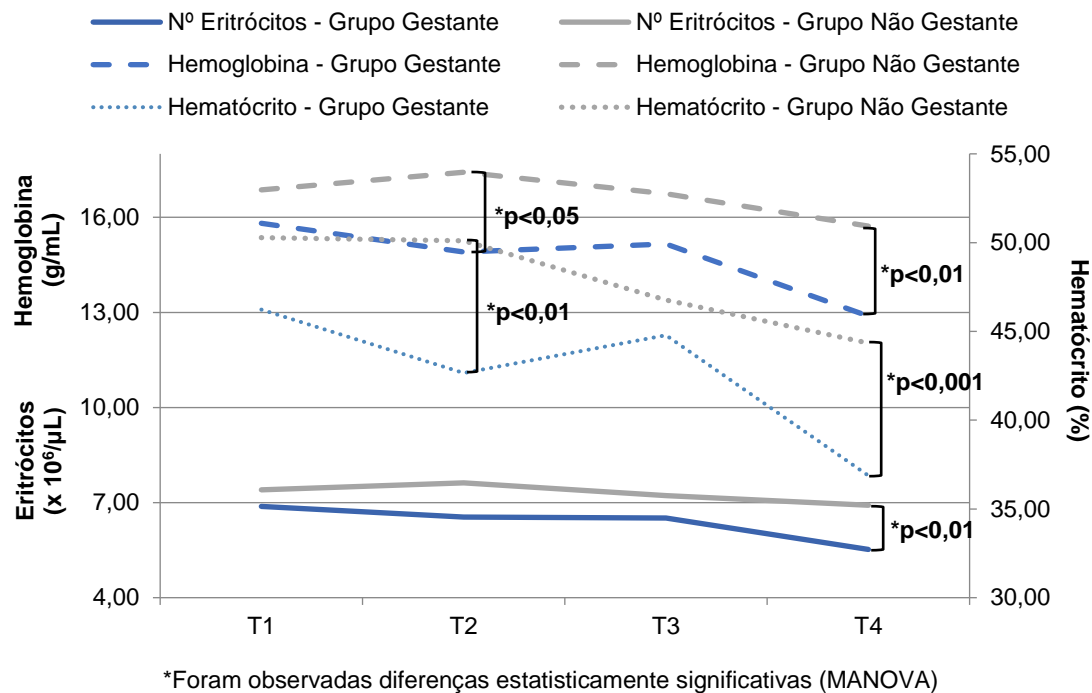
T1: estro; **T2:** 25-35d após o pico de LH; **T3:** 40-50d após o pico de LH; **T4:** 61-63d após o pico de LH

VCM- Volume Corpuscular Médio; HCM- Concentração de Hemoglobina Média; CHCM- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

Embora se observe uma ligeira flutuação nos valores de hemoglobina, hematócrito e no número de eritrócitos em ambos os grupos, podemos constatar que, comparativamente com o grupo não gestante, o eritrograma do grupo gestante foi caracterizado por apresentar menor número de eritrócitos ($p < 0,005$), menor concentração de hemoglobina ($p < 0,001$) e menor valor de hematócrito ($p < 0,001$) (Tabela 3 e Gráfico 1). Estas diferenças foram mais marcadas nos tempos T2 e T4: menor número de eritrócitos em T4 ($p < 0,01$); menor concentração de

hemoglobina em T2 ($p < 0,05$) e T4 ($p < 0,01$) e menor valor de hematócrito em T2 ($p < 0,01$) e T4 ($p < 0,001$) (Tabela 3 e Gráfico 1). No grupo gestante, no tempo T4, foram observadas diminuições significativas no número de eritrócitos, na concentração de hemoglobina e no valor de hematócrito, tendo 5 cadelas apresentado uma anemia normocítica, normocrômica ligeira no período pré-parto.

Gráfico 1 - Comparação do número de eritrócitos e dos valores de hemoglobina e hematócrito ao longo do estro e diestro, entre cadelas gestantes e não gestantes da raça Retriever do Labrador.



Comparativamente com o grupo não gestante, o leucograma do grupo gestante foi caracterizado por apresentar maior número de leucócitos ($p < 0,01$), de neutrófilos ($p < 0,01$) e de monócitos ($p < 0,05$). Estas diferenças foram mais marcadas nos tempos T3 e T4: no número de leucócitos em T3 ($p < 0,05$) e de neutrófilos em T3 ($p < 0,01$) e T4 ($p < 0,01$) (Tabela 4 e Gráfico 2). No grupo gestante, 6 cadelas apresentaram leucocitose, devido a neutrofilia, em T4.

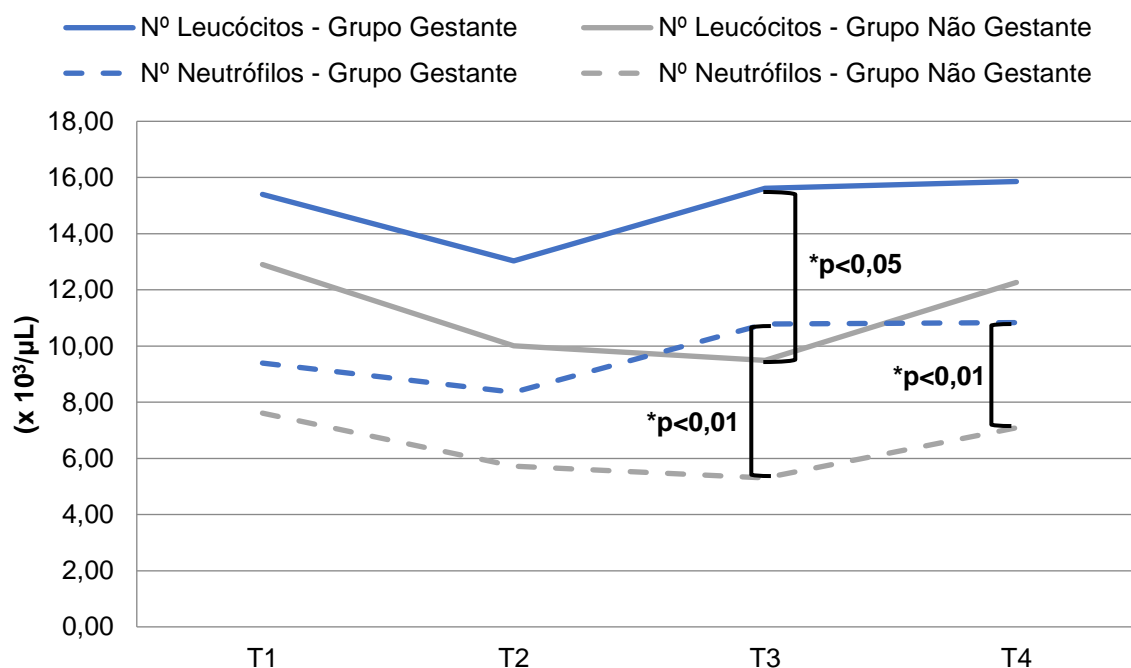
Tabela 4 - Valores médios (\pm erro padrão) do leucograma, desde o estro até ao final do diestro (T1 a T4), no grupo das cadelas gestantes (n=11) e no grupo das cadelas não gestantes (n=8) da raça Retriever do Labrador.

Leucograma	Grupo Gestante				Grupo Não gestante			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
Leucócitos (x 10 ³ /μL)	15,39 ^a (0,87)	13,03 ^b (0,87)	15,62 ^a (0,96)	15,86 ^a (0,89)	12,90 ^a (1,28)	10,01 ^b (1,30)	9,49 ^b (1,43)	12,27 ^{ab} (1,32)
Neutrófilos (x 10 ³ /μL)	9,40 ^a (0,69)	8,35 ^{ab} (0,74)	10,78 ^{ac} (0,69)	10,83 ^{ac} (0,74)	7,61 ^a (1,03)	5,72 ^b (1,09)	5,30 ^b (1,02)	7,08 ^{ab} (1,10)
Linfócitos (x 10 ³ /μL)	4,36 ^a (0,38)	2,90 ^{bc} (0,37)	3,19 ^{bc} (0,40)	3,54 ^{ac} (0,53)	4,48 (0,56)	3,24 (0,55)	3,30 (0,59)	2,09 (0,78)
Monócitos (x 10 ³ /μL)	0,99 (0,09)	1,18 (0,16)	0,74 (0,12)	0,91 (0,11)	0,53 (0,14)	0,56 (0,23)	0,47 (0,17)	0,68 (0,16)
Eosinófilos (x 10 ³ /μL)	0,63 (0,07)	0,60 (0,07)	0,90 (0,27)	0,58 (0,18)	0,30 (0,11)	0,50 (0,11)	0,42 (0,40)	0,70 (0,26)

Dentro de cada grupo, células com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$) (MANOVA)

T1: estro; T2: 25-35d após o pico de LH; T3: 40-50d após o pico de LH; T4: 61-63d dias após o pico de LH

Gráfico 2 - Comparação do número de leucócitos e de neutrófilos ao longo do estro e diestro, entre cadelas gestantes e não gestantes da raça Retriever do Labrador.



*Foram observadas diferenças estatisticamente significativas (MANOVA)

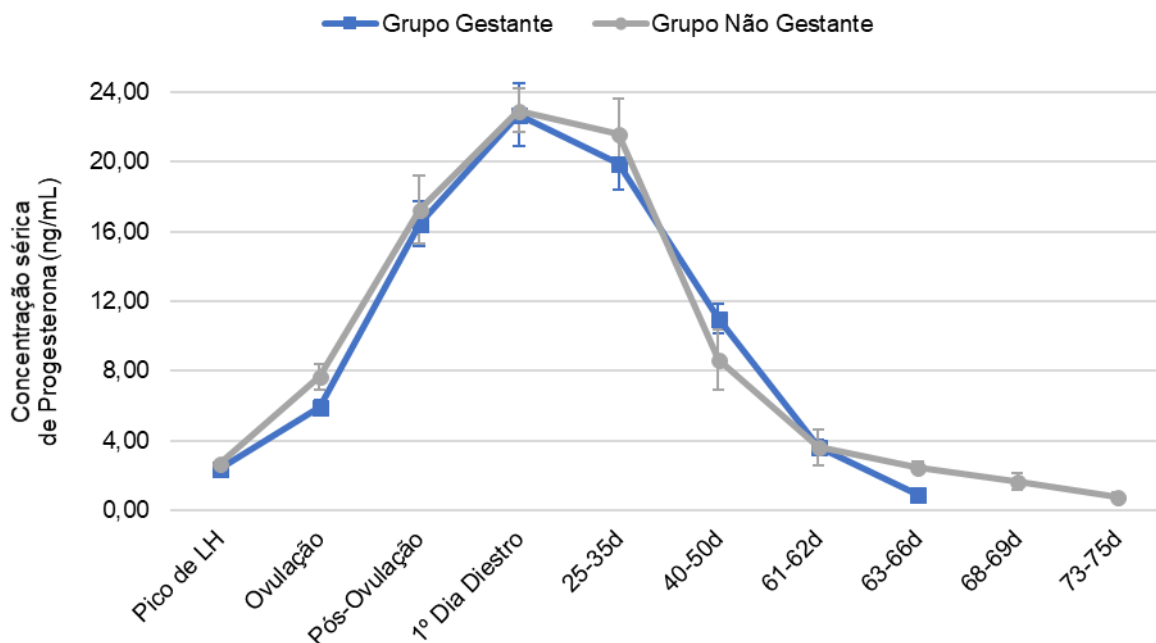
Independentemente do grupo, foi observado uma diminuição do número de leucócitos e de neutrófilos do estro (T1) para a primeira metade do diestro (T2), que se manteve até 2/3 do diestro (T3) no grupo não gestante. No grupo gestante observou-se um aumento do número

de leucócitos e neutrófilos da primeira metade da gestação para a segunda metade da gestação (T2 para T3 e T4).

1.2 Perfil de Progesterona

As concentrações de progesterona no estro e no diestro até aos 61-62 dias após o pico de LH foram semelhantes entre os dois grupos (Gráfico 3). No grupo gestante ($n = 18$), o diestro terminou entre os 63-66 dias após o pico de LH, registando-se uma concentração sérica de progesterona média de $0,90 (\pm 0,36)$ ng/mL. Em contraste, no grupo não gestante ($n = 8$) o diestro terminou, na maioria das cadelas, entre os 73-75 dias após o pico de LH, altura em que se atingiu uma concentração sérica média de $0,80 (\pm 0,26)$ ng/mL.

Gráfico 3 - Perfis de progesterona ao longo do estro e diestro em cadelas gestantes ($n = 18$) e não gestantes ($n = 8$) da raça Retriever do Labrador.


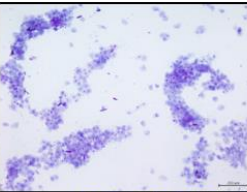
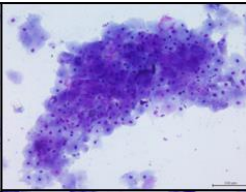
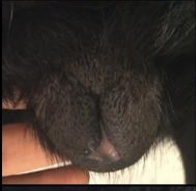
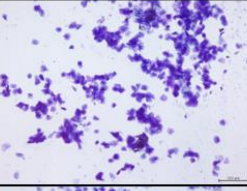
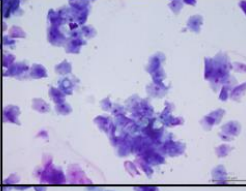

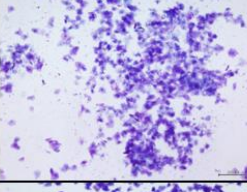
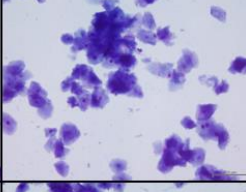
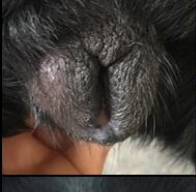
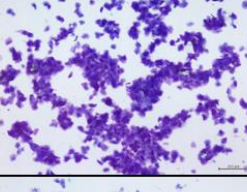
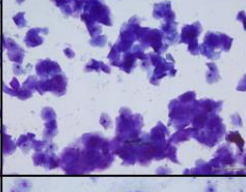

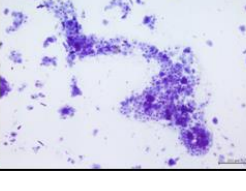
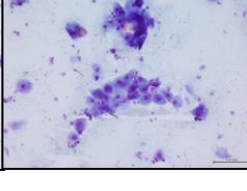


2. Monitorização do ciclo éstrico

Em todas as cadelas ($n = 26$), a monitorização do proestro até ao início do diestro foi feita através da observação do grau de edema e de turgidez da vulva, da presença e tipo de corrimento vulvar, de citologias vaginais e do doseamento sérico de progesterona. Pela citologia vaginal foi possível identificar o início do estro e do diestro citológico. Através do doseamento de progesterona foi possível identificar o dia do pico de LH e o período da ovulação, dois marcos importantes que permitem determinar os dias em que a fertilidade será máxima.

A Figura 1 exemplifica a evolução do ciclo éstrico da cadela, desde o proestro até ao início do diestro citológico, tendo em consideração as alterações da vulva, da citologia vaginal e da concentração sérica de progesterona.

Figura 1 - Evolução do ciclo éstrico da cadela, desde o proestro até ao início do diestro citológico, tendo em consideração as alterações da vulva, da citologia vaginal e da concentração sérica de progesterona.

			Fim do Proestro 0,31 ng/mL
			Início do Estro Citológico 0,95 ng/mL
			Estro Pico de LH 2,10 ng/mL
			Estro Ovulação 7,00 ng/mL
			Início do Diestro Citológico 17,10 ng/mL

2.1 Início do Estro Citológico

O início do estro citológico ocorreu em média 4,18 (\pm 0,44) dias após a deteção do proestro pelo criador (corrimento vulvar), apresentando uma variação de 0-7 dias.

2.2 Determinação do dia do pico de LH

A concentração sérica de progesterona média no dia do pico de LH foi de 2,14 (\pm 0,09) ng/mL. O início do estro citológico não correspondeu, na maior parte dos casos, ao início do estro endócrino, uma vez que o intervalo entre a primeira citologia de estro e o pico de LH foi em média de 1,52 (\pm 0,39) dias, com uma variação de 0-6 dias.

2.3 Determinação do dia da ovulação

O dia de ovulação ocorreu em média 7,91 ($\pm 0,60$) dias após a detecção do proestro pelo criador, 3,95 ($\pm 0,38$) dias após o início do estro citológico, e 2,43 ($\pm 0,11$) dias após o pico de LH, apresentando uma variação de 2-13 dias, de 2-9 dias, e de 2-3 dias respectivamente. A concentração sérica de progesterona média nesse dia foi de 5,90 ($\pm 0,43$) ng/mL.

2.4 Início do Diestro Citológico

O início do diestro citológico ocorreu em média 12,26 ($\pm 0,62$) dias após a detecção do proestro pelo criador, 8,43 ($\pm 0,46$) dias após o início do estro citológico, e 6,87 ($\pm 0,20$) dias após o pico de LH, apresentando uma variação de 6-18 dias, de 6-14 dias, e de 5-9 dias respectivamente. A concentração sérica de progesterona média nesse dia foi de 22,79 ($\pm 1,23$) ng/mL.

3. Previsão da data do parto

No grupo gestante determinou-se a precisão da previsão da data do parto a partir da data da primeira e última IA, do dia do pico de LH, do dia de início do diestro citológico. Foi feita, ainda, a determinação das concentrações de progesterona nos 3 dias antes do parto.

3.1 Previsão da data do parto a partir da data da primeira e da última IA

O tempo de duração médio da gestação foi de 61,54 ($\pm 0,56$) dias e de 59,18 ($\pm 0,40$) dias, apresentando uma variação de 58-66 dias e de 56-62 dias, após a data da primeira e da última IA, respectivamente. As precisões da previsão da data do parto (expressa em %), com base na data da primeira e da última IA estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Precisão da previsão da data do parto (expressa em %), com erro de 1 ou 2 dias, com base na data da primeira e da última inseminação artificial (IA).

Precisão (%)		
Erro	Primeira IA	Última IA
± 1 dia	46,2	47,1
± 2 dias	76,9	94,1
Tempo de gestação = data IA + 60 dias		

3.2 Previsão da data do parto a partir da data do pico de LH

O tempo de duração médio da gestação foi de 64,33 ($\pm 0,23$) dias após a data do pico de LH, apresentando uma variação de 63-66 dias. A precisão da previsão da data do parto (expressa em %), com base na data do pico de LH está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Precisão da previsão da data do parto (expressa em %), com erro de 1 ou 2 dias, com base na data do pico da Hormona Luteinizante (LH).

Erro	Precisão (%)
± 1 dia	86,7
± 2 dias	100,0
Tempo de gestação = data do pico de LH + 65 dias	

3.3 Previsão da data do parto a partir da data do primeiro dia de diestro citológico

O tempo de duração médio da gestação foi de 57,47 ($\pm 0,32$) dias após a data de início do diestro citológico, apresentando uma variação de 56-60 dias. A precisão da previsão da data do parto (expressa em %), com base na data de início do diestro citológico está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 - Precisão da previsão da data do parto (expressa em %), com erro de 1, 2 ou 3 dias, com base na data de início do diestro citológico.

Erro	Precisão (%)
± 1 dia	86,7
± 2 dias	86,7
± 3 dias	100,0
Tempo de gestação = data de início do diestro citológico + 57 dias	

3.4 Avaliação da concentração sérica de progesterona antes do parto

Os valores médios de concentração sérica de progesterona desde 3 dias pré-parto até ao dia do parto estão apresentados na Tabela 8. É de notar uma diminuição progressiva da

concentração sérica de progesterona até ao parto, mais acentuada entre as 24h pré-parto e o dia do parto ($p < 0,001$).

Tabela 8 - Concentração sérica de progesterona média (\pm erro padrão) aos 3 dias, 2 dias e 1 dia antes do parto, e no dia do parto.

	Dias antes do parto			
	-3	-2	-1	0
	n=5	n=8	n=5	n=8
Progesterona (ng/mL)	6,12 (\pm 0,97) ^a	3,85 (\pm 0,42) ^b	2,00 (\pm 0,37) ^c	0,49 (\pm 0,05) ^d
Variação	3,80 – 9,60	2,40 – 5,70	1,00 – 2,80	0,20 – 0,69

n = número de cadelas; células com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0,05$) (ANOVA)

4. Caracterização do desempenho reprodutivo em dois anos consecutivos sem monitorização do proestro/estro

A partir dos dados registados pelo criador referentes aos anos de 2015/2016 (22 cadelas) e 2016/2017 (36 cadelas) foi possível determinar vários parâmetros reprodutivos e compará-los com os registados no nosso trabalho, referente ao ano de 2017/2018 (18 cadelas).

A duração média da gestação nesses anos foi de 62,13 (\pm 0,38) dias e de 56,48 (\pm 0,38) dias, com uma variação de 57-69 dias e de 47-61 dias, a partir a data da primeira e da última IA, respetivamente. Quando comparados com os resultados obtidos no ponto 3.1, pode-se constatar que a duração média da gestação a partir da data da última IA foi menor no grupo em que não houve monitorização do ciclo éstrico ($56,48 \pm 0,38$ vs. $59,19 \pm 0,40$; $p < 0,001$). As precisões da previsão da data do parto, a partir destas duas datas estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Precisão da previsão da data do parto (expressa em %), com erro de 1 ou 2 dias, com base na data da primeira e da última inseminação artificial (IA), relativa aos dois anos sem monitorização do proestro/estro.

Erro	Precisão (%)	
	Primeira IA	Última IA
\pm 1 dia	33,3	21,7
\pm 2 dias	53,3	39,1

Tempo de gestação = data IA + 60 dias

Quando se compara os dados da Tabela 9 com os dados da Tabela 5 pode observar-se que as precisões da previsão da data do parto a partir da data da última IA (± 1 dia $p < 0,05$; ± 2 dias, $p < 0,001$), são melhores quando há monitorização do ciclo éstrico. Embora também tenha havido uma melhoria na previsão da data do parto a partir da primeira IA, esta não apresentou uma significância estatística.

A comparação do nº de IA médio por gestação, da prolificidade e da fertilidade entre IA nos anos com e sem monitorização do ciclo éstrico está apresentada na Tabela 10. Nos anos em que não houve monitorização do ciclo éstrico, observou-se um maior número médio de IA por cadela comparativamente ao período em estudo ($p < 0,001$) (Tabela 10). No entanto, não foram observadas diferenças significativas no que respeita à fertilidade e à prolificidade. É de registar, no entanto, que a fertilidade melhorou em 10,48 pontos percentuais.

Tabela 10 - Comparação do nº de inseminações artificiais (IA) médio (\pm erro padrão) por gestação, da prolificidade (\pm erro padrão) e da fertilidade, entre cadelas com e sem monitorização do proestro/estro.

	IA sem monitorização do proestro/estro		IA com monitorização do proestro/estro
	Ninhadas 2015/2016	Ninhadas 2016/2017	Ninhadas 2017/2018
Nº IA por cadela	3,23 (0,25)	3,77 (0,20)	2,00 (0,20)
Prolificidade	8,94 (0,52)	7,87 (0,46)	8,41 (0,68)
Fertilidade (%)	81,82	86,11	94,44

Monitorização do proestro/estro: realização de citologias vaginais e doseamento sérico de progesterona.

VI. DISCUSSÃO

A gestação na cadela é um período em que ocorrem várias alterações fisiológicas (Feldman & Nelson, 2004), que devem ser do conhecimento do Médico Veterinário para que não sejam julgadas como patológicas. Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar algumas destas alterações, mais precisamente ao nível do hemograma e dos perfis da concentração sérica de progesterona. Por forma a minimizar a influência da raça e do manejo a que os animais estão sujeitos, foram utilizadas apenas cadelas da raça Retriever do Labrador, pertencentes a um só canil.

No presente estudo, observou-se uma anemia normocítica, normocrômica ligeira no período pré-parto em 5 das 11 cadelas do grupo gestante. Verificando-se, durante a gestação, uma diminuição do número de eritrócitos e dos valores de hemoglobina e hematócrito, sem alteração dos índices eritrocitários (VCM, HCM, CHCM). Os resultados obtidos foram ligeiramente superiores aos de Concannon, Powers, Holder, & Hansel (1977) e de Kaneno, Nakayama, Igarashi, & Hirose (1993), e ligeiramente inferiores aos observados por Dimçó et al. (2013). No entanto, estes últimos autores só avaliaram o hemograma uma vez durante a segunda metade da gestação, não discriminando a altura exata. No estudo de De Cramer, Joubert, & Nöthling (2016), o hematócrito só atingiu valores semelhantes aos obtidos no presente estudo em T4 (36,8%) após a cesariana, sendo os valores antes do parto (44,8%) semelhantes aos obtidos em T3. A anemia gestacional da segunda metade da gestação é considerada uma anemia relativa, pois o que existe de facto é uma hemodiluição provocada pelo aumento do volume plasmático total (Concannon, 1986). A diminuição do tempo de semi-vida dos eritrócitos poderá ser outra causa da diminuição do número de eritrócitos, tal como constado na mulher gestante (Chandra, Tripathi, Mishra, Amzarul, & Vaish, 2012). A redução do hematócrito leva a uma diminuição da viscosidade do sangue, que por sua vez tem repercussões benéficas a nível de hemodinâmica para a fêmea gestante (Morrison & Parrish, 2016).

Comparativamente ao diestro não gestante, a segunda metade do diestro gestante foi caracterizada por um maior número de leucócitos e de neutrófilos circulantes, sendo que 6 das 11 cadelas apresentaram uma leucocitose, devido a neutrofilia, no pré-parto. Estes resultados contrariam os verificados por Mshelia et al. (2005), que observaram uma leucopenia gestacional, mas suportam os de Dimçó et al. (2013), que obtiveram resultados similares. De igual modo, na mulher também se observa uma leucocitose durante a gestação (Chandra et al., 2012). A leucocitose na segunda metade da gestação está associada ao stress fisiológico induzido por esta que leva ao aumento das concentrações de cortisol (Awodu, Enosolease, Ubaru, & Famodu, 2002).

Verificou-se ainda, em ambos os grupos, uma diminuição no número de leucócitos, nomeadamente de neutrófilos, do estro para a primeira metade do diestro, que se manteve

até 2/3 do diestro no grupo não gestante. Estes resultados opõem-se aos de Mshelia et al. (2005), que verificaram um aumento significativo do número de leucócitos na transição de estro para diestro em fêmeas não gestantes. Contudo, as elevadas concentrações de progesterona que se verificam nesta fase de diestro, principalmente nos primeiros 2/3, podem justificar os resultados obtidos neste estudo. Esta hormona inibe a produção de quimiocinas no útero, responsáveis pela ativação leucocitária, nomeadamente de neutrófilos, linfócitos e monócitos, sendo importante na fase de implantação para impedir a reabsorção embrionária e permitir a manutenção da gestação (Sugiura et al., 2004). Por outro lado, estudos *in vitro*, mostraram que a progesterona leva a uma diminuição da atividade dos neutrófilos quer ao nível da fagocitose quer ao nível da capacidade oxidativa (Bartoskova et al., 2014). Esta diminuição da imunidade predispõe ao desenvolvimento da piómetra, doença que é característica de cadelas inteiras em diestro (Mateus et al., 2013). Também na mulher, o número de neutrófilos varia ao longo do ciclo menstrual, verificando-se um maior número de neutrófilos circulantes quando as concentrações plasmáticas de estradiol-17 β estão mais elevadas (Blesson, 2011). Na cadela, este facto é de extrema importância devido ao longo período de proestro e estro, durante o qual o cérvix se encontra aberto, possibilitando a contaminação bacteriana ascendente da vagina para o útero. Nas fêmeas gestantes, a diminuição no número de linfócitos foi a razão que mais contribuiu para a diminuição do número de leucócitos. De igual forma, na mulher, o número de linfócitos diminui durante o primeiro e segundo trimestre de gestação e aumenta durante o terceiro trimestre de gestação (Chandra et al., 2012). Na gestação, o efeito supressor da progesterona ao nível dos linfócitos é mediado por recetores específicos para a progesterona que se encontram nestas células, não envolvendo a ação do cortisol (Szekeres-Bartho, Philibert, & Chaouat, 1990).

A progesterona é totalmente de origem lútea na cadela e a manutenção da gestação depende da secreção desta hormona (devendo os níveis plasmáticos permanecerem acima dos 2 ng/mL) (Johnston et al., 2001), sendo por isso crucial, na prática clínica, monitorizar os níveis de progesterona sérica nas cadelas gestantes, principalmente em casos de suspeita de hipoluteinismo, em que é necessário suplementar com progestagénios (Görlinger, Galac, Kooistra, & Okkens, 2005).

As concentrações de progesterona sérica observadas neste estudo foram similares nos grupos gestante e não gestante, durante todo o estro até aos dias 61-62 após o pico de LH. Estes resultados vão de encontro aos observados em vários estudos (Concannon, 2011), em que os perfis da concentração sérica de progesterona média não diferem significativamente no diestro gestante e no diestro não gestante, não podendo ser usada para diagnóstico de gestação. No entanto, no estudo de Polisca et al. (2013), no qual as colheitas de sangue foram feitas 3 vezes por semana, as cadelas gestantes apresentaram concentrações de progesterona superiores desde o dia 37 até ao dia 52 de diestro, comparativamente com cadelas não gestantes. Esta observação poderá estar relacionada com as concentrações

mais elevadas de relaxina e prolactina observadas nas fêmeas gestantes (Concannon, 2009; revisto por Verstegen-Onclin & Verstegen, 2008).

A partir dos dias 61-62 após o pico de LH verificou-se uma diminuição abrupta na concentração sérica de progesterona no grupo gestante, quando comparada com a observada no grupo não gestante, tendo o diestro terminado entre os 73-75 dias no grupo não gestante e os 63-66 dias no grupo gestante, após o pico de LH. De todos os animais domésticos, a espécie canina é a única em que se observa uma duração da fase lútea em animais não gestantes mais prolongada do que em animais gestantes (Hoffmann et al., 2004). Em cadelas não gestantes, o CL é independente de qualquer agente luteolítico uterino, pelo que este completa assim o seu tempo de vida inerente, passando lentamente por um processo apoptótico. Este é caracterizado por degenerescência gorda e é desprovido de um princípio luteolítico ativo. Pelo contrário, nas cadelas gestantes, a regressão lútea, inicialmente lenta, é interrompida por uma luteólise súbita pré-parto, associada a níveis elevados de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Kowalewski, 2014).

A determinação do período fértil é essencial quando se quer maximizar a fertilidade da cadela. Esta determinação torna-se crucial quando a cadela tem problemas reprodutivos ou quando a qualidade do sémen é inferior ao esperado. A citologia vaginal e o doseamento sérico de progesterona são métodos utilizados na prática clínica, sendo possível, através das citologias vaginais, determinar o início do estro e do diestro citológico e, através do doseamento de progesterona, determinar o dia do pico de LH e da ovulação.

No presente estudo, observou-se que o início do estro citológico foi, em média, 4,18 ($\pm 0,44$) dias após a deteção do proestro pelo criador (corrimento vulvar), apresentando uma variação de 0-7 dias. Através destes resultados, foi possível notar que na maioria dos casos o início do proestro não é detetado na altura correta pelo criador, uma vez que, quando este deteta o corrimento, as cadelas já se encontram muitas vezes em estro. De igual modo, este facto justifica a menor duração do intervalo entre o início do proestro e o início do diestro citológico observado, o qual foi 12,26 ($\pm 0,62$) dias, comparativamente aos 20,1 ($\pm 1,9$) dias registados por Moxon, Batty, Irons, & England (2012).

O intervalo entre a primeira citologia de estro e o pico de LH foi, em média, 1,52 ($\pm 0,39$) dias, tendo uma variação de 0-6 dias, podendo-se inferir que o início do estro citológico não corresponde, na maior parte dos casos, ao início do estro endócrino. Como o início do estro citológico pode variar entre -6 a +4 dias, em relação ao pico de LH, e a altura do índice máximo de queratinização das células do epitélio vaginal é variável entre cadelas, não é aconselhável usar tal parâmetro para prever o pico de LH ou o momento da ovulação (Johnston et al., 2001). Deste modo, a citologia vaginal deve ser utilizada para verificar se a cadela se encontra em estro, devendo nesta altura começar a fazer-se o doseamento sérico de progesterona para determinar o dia ideal para cruzar/inseminar a cadela. O aumento pré-ovulatório da concentração sérica de progesterona devido à luteinização precoce da parede dos folículos é

uma particularidade única da reprodução dos canídeos (Concannon et al., 1977a). Este facto permite determinar o dia do pico de LH e o período de ovulação a partir da medição da progesterona.

No presente estudo, a concentração sérica média de progesterona no dia do pico de LH foi 2,14 (\pm 0,09) ng/mL. Este valor é ligeiramente superior ao registado por Cohen, Holle, & Meyers-Wallen (2009) e por Kutzler et al. (2003), que observaram uma concentração sérica média de progesterona, no dia do pico de LH, de 1,97 (\pm 0,66) ng/mL e de 2,02 (\pm 0,18) ng/mL, respetivamente. Os valores observados no presente estudo, provavelmente, aproximam-se mais dos de Kutzler et al. (2003) do que dos observados por Cohen et al. (2009), dado que neste último estudo o pico de LH foi identificado por doseamento direto da concentração de LH com auxílio de um *kit* comercial (Witness® LH test). O intervalo médio obtido entre o pico de LH e a ovulação foi de 2,43 (\pm 0,11) dias, o que está de acordo com o esperado (England & Concannon, 2002). O intervalo médio obtido entre o início do diestro citológico e o pico de LH foi de 6,87 (\pm 0,20) e apresentou uma variação de 5-9 dias. O intervalo observado no presente estudo foi inferior aos 8 a 9 dias registados pelo estudo de Holst & Phemister (1974), no qual foi definido o critério de início de diestro citológico aqui utilizado.

A determinação precisa da data de parto é crucial para que haja uma correta monitorização da gestação e uma ótima assistência aquando do parto, e torna-se particularmente importante quando é necessário planear uma cesariana eletiva. O segundo objetivo deste trabalho foi, então, avaliar a precisão da deteção da data do parto utilizando como referência a data da primeira e da última IA, do pico de LH e do início do diestro citológico, e avaliar a concentração sérica de progesterona antes do parto.

No presente estudo, a data do pico de LH mostrou ser o método mais preciso para prever a data do parto com um erro de até dois dias. A duração média da gestação foi de 64,33 (\pm 0,23) dias após o pico de LH e a precisão da previsão da data do parto, com base na data do pico de LH foi de 86,7% (65 ± 1 dia) e de 100% (65 ± 2 dias). Estes resultados mostraram um tempo médio de gestação para a raça Retriever do Labrador mais de encontro ao esperado, quando comparados com os 62,9 (\pm 1,3) dias verificados por Eilts, Davidson, Hosgood, Paccamonti, & Baker (2005) para esta raça. As precisões obtidas foram melhores do que as registadas por Kutzler et al. (2003). Estes autores obtiveram precisões de 67% (65 ± 1 dia), de 90% (65 ± 2 dias) e de 100% (65 ± 3 dias). Ambos os estudos consideraram o dia do pico de LH como o dia em que a concentração sérica de progesterona atingiu um valor superior a 1,5 ng/mL, seguido de um aumento para valores de 4,0-10,0 ng/mL nos dias seguintes. O estudo de Cohen et al. (2009), no qual o dia do pico de LH foi determinado por doseamento da concentração de LH, registou precisões semelhantes ao presente trabalho, de 82% (65 ± 1 dia) e de 100% (65 ± 2 dias).

Em contraste, De Cramer & Nöthling (2017) observaram que a data de início do diestro citológico, é um método mais preciso para prever o dia do parto do que a data do pico de LH.

Nesse estudo, a precisão de previsão da data do parto, com base no início do diestro citológico foi de 88% (57 ± 1 dia), 99% (57 ± 2 dias) e 100% (57 ± 3 dias). A margem de erro observada no presente estudo foi igual (± 3 dias), porém as precisões foram ligeiramente inferiores, registrando-se precisões de 86,7% (57 ± 1 dia), 86,7% (57 ± 2 dias) e 100% (57 ± 3 dias). Tais diferenças podem ser associadas às diferentes raças estudadas (Boerboel e Bulldog Inglês vs. Retriever do Labrador). Para além da elevada precisão da previsão da data do parto a partir da data do primeiro dia de diestro citológico, acrescenta-se a vantagem de ser um método barato e prático, do ponto de vista clínico. Porém, contrariamente à determinação do pico de LH, não permite prever a altura ideal para a cobertura/inseminação da cadela, e exige, ainda, que sejam efetuadas citologias vaginas diárias após o cruzamento/inseminação, para saber o dia exato de início do diestro citológico. A previsão da data do parto, a partir da data da primeira e da última IA mostrou ser o método menos preciso, verificando-se precisões de 46,2% (60 ± 1 dia) e 76,9% (60 ± 2 dias) e de 47,1% (60 ± 1 dia) e 94,1% (60 ± 2 dias), respetivamente.

A monitorização da concentração sérica de progesterona pode ser um método útil e prático para prever a data do parto, pois as concentrações séricas desta hormona diminuem 24-48h antes do parto, para valores inferiores a 2 ng/mL (Veronesi et al., 2002). Este conceito é de extrema importância quando se pretende fazer uma cesariana eletiva (Kim et al., 2007).

Neste estudo foi observada uma diminuição significativa entre o dia -2 (48h pré-parto) e o dia -1 (24h pré-parto) ($p < 0,05$), e entre o dia -1 (24h pré-parto) e o dia do parto ($p < 0,001$).

No entanto, 24h antes do parto, apenas metade das cadelas registaram concentrações de progesterona inferiores ao *cut-off* de 2 ng/mL (Veronesi et al., 2002). Estes autores utilizaram o método RIA para dosear as concentrações de progesterona. Recentemente foi demonstrado que quando o método de determinação é o CLIA, como é o caso do presente estudo, o *cut-off* é de 3,4 ng/mL (Rota et al., 2015). Assim, os resultados observados vão de encontro aos observados por estes últimos autores, uma vez que 24h antes do parto todas as cadelas registaram valores inferiores a 3,4 ng/mL. Segundo o estudo mais recente de De Cramer & Nöthling (2018), no qual foi utilizado o RIA como método de determinação, foram criados 3 *cut-offs*, úteis para quando se faz um único doseamento de progesterona pré-parto: de 5 ng/mL, com o qual se concluiu que é improvável que o parto ocorra nas próximas 12h; de 2,7 ng/mL, com o qual se concluiu que é provável que o parto ocorra nas próximas 48h, mas improvável que seja nas próximas 12h; de 1 ng/mL com o qual se concluiu que é provável que o parto ocorra nas próximas 12h. Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com o *cut-off* de 5 ng/mL apresentado por De Cramer & Nöthling (2018), porém os *cut-offs* de 2,7 e de 1 ng/mL não se verificaram úteis. Uma vez que os valores de progesterona variam de forma marcada entre cadelas, é necessária uma avaliação diária da concentração de progesterona até se atingir os *cut-offs* descritos anteriormente. Na prática diária, e fora os casos de cesariana eletiva, os tutores/criadores são aconselhados a medir a temperatura retal, visto

que esta diminui 1°C cerca de 14h depois da descida da concentração sérica de progesterona (Johnston et al., 2001). Este método é controverso, havendo estudos que demonstram que não existe uma diferença significativa na temperatura retal entre as 48h pré-parto e o parto (Veronesi et al., 2002).

Uma correta monitorização do estro permite determinar não só a data do pico de LH e a data da ovulação que são utilizadas para prever o período ideal para cobertura/inseminação, como também a data do parto (England & Concannon, 2002). O terceiro, e último, objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto da monitorização do proestro/estro na performance reprodutiva. Muitos criadores utilizam a data do primeiro cruzamento para prever a data do parto, acrescentado 60 dias ao dia do cruzamento. Os resultados deste estudo demonstram que o intervalo entre a primeira IA e o parto pode ser bastante variável, tendo variado entre 58 e 66 dias. No entanto, pode existir uma variação de 57 a 72 dias entre o primeiro cruzamento e o parto (Concannon et al., 1983). Neste estudo o intervalo entre a primeira IA e o parto foi semelhante nos ciclos com e sem monitorização, tendo variado entre 58-66 dias e 57 -69 dias, respetivamente. Este resultado pode dever-se ao facto de que, nem sempre, o criador tomou em conta as recomendações transmitidas. Quando se compara o intervalo entre a última IA e o parto, pode constatar-se que a duração média da gestação a partir da data da última IA foi menor no grupo em que não houve monitorização do ciclo éstrico ($56,48 \pm 0,38$ vs. $59,19 \pm 0,40$; $p < 0,001$), verificando-se que as precisões da previsão da data do parto a partir da data da última IA (± 1 dia $p < 0,05$; ± 2 dias, $p < 0,001$) foram melhores no ano em que houve monitorização do ciclo éstrico (2017/2018). Estes resultados demonstram o importante papel do Médico Veterinário, visto que, monitorizando o proestro/estro é possível determinar a altura ideal para a cobertura/inseminação da cadela. Deste modo, as inseminações são realizadas em datas mais corretas e o tempo de gestação aproxima-se mais dos 60 dias após a data da última IA, verificando-se um aumento significativo na precisão de previsão da data do parto a partir da última IA. A reforçar este facto, está a diminuição significativa do número de IA por cadela de 3,23 (2015/2016) e 3,77 (2016/2017) para 2 no ano de 2017/2018, período em que em que houve seguimento do proestro/estro das cadelas reprodutoras. Ao diminuir-se o número de cruzamentos/IA está-se a diminuir o grau de contaminação uterina e a sobre utilização do macho. O cruzamento/inseminação em datas erradas constitui a causa mais comum de infertilidade aparente na cadela (England & Concannon, 2002).

Neste estudo, embora não tenha sido estatisticamente significativo, observou-se que a fertilidade aumentou de 81,82% (2015/2016) e 86,11% (2016/2017) para 94,44% (2017/2018). O elevado número de inseminações efetuadas pelo criador nos anos de 2015/2016 e 2016/2017, as quais cobriram grande parte do período fértil da cadela, poderá ter contribuído para a boa fertilidade observada nesses anos.

VII. CONCLUSÃO

Das alterações fisiológicas características da gestação destacam-se a diminuição do número de eritrócitos, da concentração de hemoglobina e do valor de hematócrito e um maior número de leucócitos e de neutrófilos circulantes, verificando-se nalguns casos, no pré-parto, uma anemia normocítica, normocrômica ligeira e uma leucocitose, devido a neutrofilia. Estas alterações são mais evidentes no período pré-parto e devem ser reconhecidas pelo Médico Veterinário. Pelo facto do perfil das concentrações séricas de progesterona ser semelhante entre fêmeas gestante e não gestantes, o seu doseamento não permite inferir se a fêmea está ou não gestante. A monitorização do proestro/estro é vantajosa, pois permite prever o período ideal para a cobertura/inseminação, bem como a data do parto. Na prática clínica, a citologia vaginal deve ser utilizada para verificar se a cadela se encontra em estro, devendo nesta altura começar a fazer-se o doseamento sérico de progesterona para determinar o período de fertilidade máxima. A determinação precisa da data de parto é crucial para que haja uma correta monitorização da gestação e uma ótima assistência aquando do parto, sendo, por isso, necessário utilizar métodos práticos para prever a data. O método mais preciso para prever a data do parto foi o dia do pico de LH. A monitorização da concentração sérica de progesterona nos dias que antecedem o parto é essencial quando se opta por uma cesariana eletiva. Através da monitorização do ciclo éstrico foi possível melhorar as precisões da previsão da data do parto com base na data da última IA e, ainda, diminuir o número de IA por cadela. Este último aspeto é vantajoso quer do ponto de vista clínico, quer de gestão do canil, visto que permite diminuir a contaminação uterina e a utilização do macho.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Alonge, S., Beccaglia, M., Melandri, M., & Luvoni, G. C. (2016). Prediction of whelping date in large and giant canine breeds by ultrasonography foetal biometry. *Journal of Small Animal Practice*, 57(9), 479–483. <https://doi.org/10.1111/jsap.12534>
- Awodu, O. a, Enosolease, M. E., Ubaru, a G., & Famodu, a a. (2002). Leucocyte counts in pregnant Nigerian women with sickle cell trait. *African Journal of Reproductive Health*, 6(3), 112–116.
- Bartoskova, A., Ondrackova, P., Leva, L., Vitasek, R., Novotny, R., Janosovska, M., & Faldyna, M. (2014). The effects of in vitro exposure to progesterone and estradiol-17 β on the activity of canine neutrophils. *Veterinari Medicina*, 59(4), 202–209. <https://doi.org/10.17221/7481-VETMED>
- Beccaglia, M., Alonge, S., Trovo', C., & Luvoni, G. C. (2016). Determination of gestational time and prediction of parturition in dogs and cats: an update. *Reproduction in Domestic Animals*, 51, 12–17. <https://doi.org/10.1111/rda.12782>
- Beccaglia, M., & Luvoni, G. C. (2012). Prediction of Parturition in Dogs and Cats: Accuracy at Different Gestational Ages. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(SUPPL. 6), 194–196. <https://doi.org/10.1111/rda.12006>
- Bell, E. T., & Christie, D. W. (1971). Duration of Proestrus, Oestrus and Vulval Bleeding in the Beagle Bitch. *British Veterinary Journal*, 127(8), xxv–xxvii. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)37435-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)37435-3)
- Bergeron, L. H., Nykamp, S. G., Brisson, B. A., Madan, P., Sears, W., & Gartley, C. J. (2014). Vaginal impedometry for detection of optimal breeding time in bitches. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 245(12), 1360–1366. <https://doi.org/10.2460/javma.245.12.1360>
- Blesson, C. S. (2011). Estrogen receptors in leukocytes - possible impact on inflammatory processes in the female reproductive system. *Update on Mechanisms of Hormone Action - Focus on Metabolism, Growth and Reproduction*, 337–350.
- Chandra, S., Tripathi, A. K., Mishra, S., Amzarul, M., & Vaish, A. K. (2012). Physiological changes in hematological parameters during pregnancy. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 28(3), 144–146. <https://doi.org/10.1007/s12288-012-0175-6>
- Chapwanya, A., Clegg, T., Stanley, P., & Vaughan, L. (2008). Comparison of the Immulite and RIA assay methods for measuring peripheral blood progesterone levels in Greyhound bitches. *Theriogenology*, 70(5), 795–799. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.047>

- Cohen, J. A., Holle, D. M., & Meyers-Wallen, V. N. (2009). Accuracy of canine parturition date prediction from LH peak. *Clin Theriogenol*, (1), 507 [Ref Type: Abstract].
- Concannon, P., Hansel, W., & McEntee, K. (1977a). Changes in LH , Progesterone Preovulatory and Sexual Luteinization Behavior Associated with in the Bitch. *Biology of Reproduction*, 17(April), 604–613.
- Concannon, P. W. (1986). Canine pregnancy and parturition. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 16(3), 453–475. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(86\)50053-X](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(86)50053-X)
- Concannon, P. W. (2000). Canine pregnancy: predicting parturition and timing events of gestation. *Recent Advances in Small Animal Reproduction*, (9 May 2000).
- Concannon, P. W. (2009). Endocrinologic Control of Normal Canine Ovarian Function. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 3–15. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01414.x>
- Concannon, P. W. (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science*, 124(3–4), 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.028>
- Concannon, P. W., & Lein, O. H. (1989). Hormonal and clinical correlates of ovarian cycles, ovulation, pseudopregnancy and pregnancy in dogs. In *Current Veterinary Therapy: X, Small Animal Practic* (pp. 1269–1282). Philadelphia, USA: W.B. Saunders Company.
- Concannon, P. W., Powers, M. E., Holder, W., & Hansel, W. (1977b). Pregnancy and parturition in the bitch. *Biology of Reproduction*, 16(4), 517–526.
- Concannon, P., Whaley, S., Lein, D., & Wissler, R. (1983). Canine Gestation Length: variation related to time of mating and fertile life of sperm. *American Journal of Veterinary Research*, 44, 1819–1821.
- De Cramer, K. G. M., Joubert, K. E., & Nöthling, J. O. (2016). Hematocrit changes in healthy periparturient bitches that underwent elective cesarean section. *Theriogenology*, 86(5), 1333–1340. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.075>
- De Cramer, K. G. M., & Nöthling, J. O. (2017). The precision of peri-oestrous predictors of the date of onset of parturition in the bitch. *Theriogenology*, 96, 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.018>
- De Cramer, K. G. M., & Nöthling, J. O. (2018). The precision of predicting the time of onset of parturition in the bitch using the level of progesterone in plasma during the preparturient period. *Theriogenology*, 107, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.018>

- Dimço, E., Abeshi, J., Lika, E., & Dharmo, G. (2013). Effect of pregnancy in hematological profile of dogs. *Albanian Journal of Agricultural Sciences*, 12(2), 159–162.
- Eilts, B. E., Davidson, A. P., Hosgood, G., Paccamonti, D. L., & Baker, D. G. (2005). Factors affecting gestation duration in the bitch. *Theriogenology*, 64(2), 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.11.007>
- England, G., & Concannon, P. W. (2002). Determination of the Optimal Breeding Time in the Bitch: Basic Considerations. *Recent Advances in Small Animal Reproduction*, (8 June 2002).
- Feldman, E. C., & Nelson, R. W. (2004). Section VII: Canine Female Reproduction. In *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction* (3rd ed.). St. Louis, Missouri: Saunders - Elsevier.
- Geiser, B., Burfeind, O., Heuwieser, W., & Arlt, S. (2014). Prediction of parturition in bitches utilizing continuous vaginal temperature measurement. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(1), 109–114. <https://doi.org/10.1111/rda.12236>
- Gil, E. M. U., Garcia, D. A. A., Giannico, A. T., & Froes, T. R. (2014). Canine fetal heart rate: Do accelerations or decelerations predict the parturition day in bitches? *Theriogenology*, 82(7), 933–941. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.025>
- Görlinger, S., Galac, S., Kooistra, H. S., & Okkens, A. C. (2005). Hypoluteoidism in a bitch. *Theriogenology*, 64(1), 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.12.011>
- Hoffmann, B., Büsges, F., Engel, E., Kowalewski, M. P., & Papa, P. (2004). Regulation of corpus luteum-function in the bitch. *Reproduction in Domestic Animals*, 39(4), 232–240. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00508.x>
- Holst, P. A., & Phemister, R. D. (1974). Onset of diestrus in the beagle bitch: Definition and significance. *American Journal of Veterinary Research*, 35, 401–406.
- Johnston, S. D., Kustritz, M. V. R., & Olson, P. N. S. (2001). Section I: The Bitch. In *Canine and Feline Theriogenology* (1st ed., pp. 16–118). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Kaneno, M., Nakayama, H., Igarashi, N., & Hirose, H. (1993). Relationship between the Number of Fetuses and the Blood Constituents of Beagles in late Pregnancy. *Journal of Veterinary Medical Science*, 55(4), 681–682. Retrieved from http://link.periodicos.capes.gov.br.ez43.periodicos.capes.gov.br/sfxlcl41?url_ver=Z39.88-2004&url_ctx_fmt=fi/fmt:kev:mtx:ctx&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&ctx_ver=Z39.88-2004&rft_id=info:sid/sfxit.com:azlist&sfx.ignore_date_threshold=1&rft.object_id=954925563641&svc.fulltext=yes

- Kim, Y. H., Travis, A. J., & Meyers-Wallen, V. N. (2007). Parturition prediction and timing of canine pregnancy. *Theriogenology*, 68(8), 1177–1182. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.018>
- Kowalewski, M. P. (2014). Luteal regression vs. prepartum luteolysis: Regulatory mechanisms governing canine corpus luteum function. *Reproductive Biology*, 14(2), 89–102. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.11.004>
- Kowalewski, M. P., Gram, A., Kautz, E., & Graubner, F. R. (2015). The Dog: Nonconformist, Not Only in Maternal Recognition Signaling. In R. D. Geisert & B. D. Fuller (Eds.), *Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals* (Tribute to, Vol. 216). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-15856-3>
- Kustritz, M. V. R. (2012). Managing the Reproductive Cycle in the Bitch. *VSP*, 42(3), 423–437. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.01.012>
- Kutzler, M. A., Mohammed, H. O., Lamb, S. V., & Meyers-Wallen, V. N. (2003). Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. *Theriogenology*, 60(6), 1187–1196. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00109-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00109-2)
- Lévy, X., & Fontbonne, A. (2007). Determining the optimal time of mating in bitches: particularities. *Rev Bras Reprod Anim*, 31(Xvii), 128–134.
- Lindsay, F. E. F., & Concannon, P. W. (1986). Normal Canine Vaginoscopy. In B. T (Ed.), *Small Animal Reproduction and Infertility* (pp. 112–120). Philadelphia: Lea and Febiger.
- Luvoni, G. C., & Beccaglia, M. (2006). The prediction of parturition date in canine pregnancy. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(1), 27–32. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00641.x>
- Mateus, L., Henriques, S., Merino, C., Pomba, C., Lopes da Costa, L., & Silva, E. (2013). Virulence genotypes of *Escherichia coli* canine isolates from pyometra, cystitis and fecal origin. *Veterinary Microbiology*, 166(3–4), 590–594. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.07.018>
- Michel, E., Spörri, M., Ohlerth, S., & Reichler, I. (2011). Prediction of Parturition Date in the Bitch and Queen. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(5), 926–932. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01763.x>
- Morrison, J., & Parrish, M. (2016). Anemia Associated with Pregnancy. *Glob. Libr. Women's Med*. <https://doi.org/10.3843/GLOWM.10164>
- Moxon, R., Batty, H., Irons, G., & England, G. C. W. (2012). Perioovulatory changes in the endoscopic appearance of the reproductive tract and teasing behavior in the bitch. *Theriogenology*, 78(9), 1907–1916. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.07.002>

- Mshelia, G. D., Amin, J. D., & Chaudhari, S. U. R. (2005). Haemogram of Nigerian Mongrel Bitch at Different Stages of the Reproductive Cycle. *Pakistan Vet. J.* 25(1), 1–3.
- Okkens, A. C., & Kooistra, H. S. (2006). Anoestrus in the Dog: a Fascinating Story. *Reproduction in Domestic Animals*, (41), 291–296. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00702.x>
- Polisca, A., Zelli, R., Troisi, A., Orlandi, R., Brecchia, G., & Boiti, C. (2013). Power and pulsed Doppler evaluation of ovarian hemodynamic changes during diestrus in pregnant and nonpregnant bitches. *Theriogenology*, 79(2), 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.08.005>
- Rendano, V. T., Lein, D. H., & Concannon, P. W. (1984). Radiographic evaluation of prenatal development in the beagle. *Vet Radiol*, 25, 132–141.
- Romagnoli, S., & Lopate, C. (2017). Reproductive Endocrinology and Breeding Husbandry of the Bitch. In S. J. Ettinger, E. C. Feldman, & E. Côté (Eds.), *Volume 2: Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the dog and the cat* (8th ed.). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Rota, A., Charles, C., Starvaggi Cucuzza, A., & Pregel, P. (2015). Diagnostic Efficacy of a Single Progesterone Determination to Assess Full-Term Pregnancy in the Bitch. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(6), 1028–1031. <https://doi.org/10.1111/rda.12631>
- Sugiura, K., Nishikawa, M., Ishiguro, K., Tajima, T., Inaba, M., Torii, R., ... Inaba, T. (2004). Effect of ovarian hormones on periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. *Immunobiology*, 209(8), 619–627. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2004.09.003>
- Szekeres-Bartho, J., Philibert, D., & Chaouat, G. (1990). Progesterone Suppression of Pregnancy Lymphocytes Is not Mediated by Glucocorticoid Effect. *AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY*, (23), 42–43.
- Tsutsui, T., & Murata, Y. (1982). Variations in Body Temperature in the Late Stage of Pregnancy and Parturition in Bitches. *Bioscienci Biotechnology Biochemistry*, 33(4), 1660–1668. <https://doi.org/10.1248/cpb.37.3229>
- Veronesi, M. C., Battocchio, M., Marinelli, L., Faustini, M., Kindahl, H., & Cairoli, F. (2002). Correlations among body temperature, plasma progesterone, cortisol and prostaglandin F2alpha of the periparturient bitch. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 49(5), 264–268. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2002.00410.x>
- Verstegen-Onclin, K., & Verstegen, J. (2008). Endocrinology of pregnancy in the dog: A review. *Theriogenology*, 70(3), 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.038>


- Wright, P. J., & Parry, B. W. (1989). Cytology of the canine reproductive system. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 19(5), 851–874.
[https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(89\)50102-5](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(89)50102-5)
- Yeager, A. E., & Concannon, P. W. (1996). Ovaries. In Green (Ed.), *Small Animal Ultrasound* (pp. 293–303). Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Yeager, A. E., Mohammed, H. O., Meyers-Wallen, V. N., Vannerson, L., & Concannon, P. W. (1992). Ultrasonographic appearance of the uterus, placenta, fetus and fetal membranes throughout accurately timed pregnancy in beagles. *American Journal of Veterinary Research*, 53, 342–351.

IX. ANEXOS


Anexo 1 - Valores de referência para o hemograma canino, Laboratório Braço Forte FMV-ULisboa.

Parâmetro	Valor de Referência
Leucócitos (x 10 ³ /μL)	6 - 17
Eritrócitos (x 10 ⁶ /μL)	5,5 - 8,5
Plaquetas (x 10 ³ /μL)	200-500
Hemoglobina (g/mL)	12 - 18
Hematócrito (%)	37 - 55
VCM (fL)	60 - 77
HCM (pg)	19,5 - 24,5
CHCM (g/dL)	32 - 36
Neutrófilos (x 10 ³ /μL)	3 - 11,5
Linfócitos (x 10 ³ /μL)	1 - 4,8
Monócitos (x 10 ³ /μL)	0,15 - 1,35
Eosinófilos (x 10 ³ /μL)	0,1 - 1,25
Basófilos (x 10 ³ /μL)	Raros

Anexo 2 - R. Dourado; B. Soares; I. Alves; L. Mateus. The accuracy of the LH peak and the onset of cytological diestrus on the prediction of parturition date in Labrador retriever bitches. Comunicação em forma de painel apresentada no 21º Congresso da European Veterinary Society of Small Animal Reproduction (EVSSAR), 22 a 23 de Junho de 2018, Veneza, Itália



The accuracy of the LH peak and the onset of cytological diestrus on the prediction of parturition date in Labrador Retriever bitches



R. Dourado¹; B. Soares¹; I. Alves²; L. Mateus³

¹ Integrated Master Student of Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, Portugal
² School of Agriculture, University of Lisbon, Portugal
³ Center for Interdisciplinary Research in Animal Health (CIISA), Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, Portugal

INTRODUCTION

In veterinary medicine, accurate determination of parturition date is crucial for pregnancy monitoring and parturition planning. As the interval between first mating and parturition can range from 57 to 72 days ⁽¹⁾, predicting the parturition date requires practical methods for breeders, clinicians and owners.

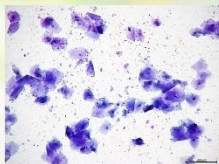
The aim of this study was to determine and compare the accuracy of predicting parturition date by counting 65 days after the LH peak day (identified indirectly by plasma progesterone concentrations) and after the onset of cytological diestrus. The same breed was used throughout the study to avoid breed related variables.

MATERIAL AND METHODS

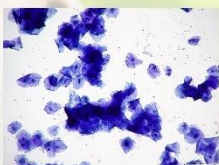
Eleven Labrador Retriever bitches were included in this study (mean age: 3.3 years; range 2-7 years). Monitorization began from proestrus until the day of parturition. Vaginal cytology and blood sampling for serum progesterone assay were collected every two days until onset of diestrus. All parturitions were witnessed by the authors and dates were registered.

The onset of cytological diestrus was considered when a decrease of at least 20% of superficial cells was observed ⁽²⁾. The LH peak day was established as the day upon which progesterone was between 1.5 – 2 ng/mL ⁽²⁾ followed by an increase to 4.0 - 10.0 ng/mL two days later. The expected parturition date was determined by adding 65 days to the LH peak date and 57 days to the onset date of cytological diestrus ⁽¹⁾.


Progesterone was assayed by chemiluminescent enzyme immunoassay (Immulite 1000 instrument, Siemens Healthcare Diagnostics, Amadora, Portugal) using a commercial kit (Immulite 1000 Progesterone kit, Siemens Healthcare Diagnostics) and vaginal cytology was stained using Diff- Quik.



**1.7 ng/mL
ESTRUS
LH PEAK DAY**



**12.3 ng/mL
ESTRUS**



**21.3 ng/mL
ONSET OF
CYTOLOGICAL
DIESTRUS**

RESULTS

PARTURITION DATE PREDICTION BASED ON LH PEAK DAY	
ACCURACY	%
65 ± 1 day	70%
65 ± 2days	100%

PARTURITION DATE PREDICTION BASED ON ONSET OF CYTOLOGICAL DIESTRUS	
ACCURACY	%
57 ± 1 day	71%
57 ± 2days	86%

CONCLUSIONS

Measuring plasma progesterone concentrations to determine the day of LH peak was a more accurate method to predict the parturition date in the bitch than the onset of the cytological diestrus. Our results are in agreement with Luvoni et al. ⁽²⁾ and in disagreement with De Cramer & Nöthling ⁽³⁾.

Although vaginal cytology may be more accessible than measuring plasma progesterone concentrations, a higher number of sequential vaginal smears are required as diestrus shift in the smear can occur from day 6 to 11 after ovulation ⁽²⁾.

References: ⁽¹⁾ Concannon PW, Whaley S, Lein D, Wissler R. Canine gestation length: variation related to time of mating and fertile life of sperm. Am J Vet Res 1983; 44:1819-1821. ⁽²⁾ Luvoni GC, Beccaglia M. The Prediction of Parturition Date in Canine Pregnancy. Reprod Dom Anim 2006; 41:27–32. ⁽³⁾ De Cramer KGM, Nöthling JO. The precision of peri-oestrous predictors of the date of onset of parturition in the bitch. Theriogenology 2017; 96:153 - 157.

Funding: UID/CVT/00276/2013 from FCT

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia

INSTRUMENTO DE POLÍTICA DE INOVAÇÃO